

**NEUROPLASZTIKUS VÁLTOZÁSOK A KÖZPONTI
IDEGRENDSZERBEN: A GONADÁLIS HORMONOK
SZEREPE**

PhD Értekezés

Kurunczi Anita

Témavezető: Dr. Párducz Árpád

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK

MTA SzBK, Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Csoport

Szeged

2009

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Balog J. A, **Kurunczi A**, Parducz A (2001)

17beta-Estradiol increases, aging decreases, c-Fos expression in the rat accessory olfactory bulb.

Neuroreport. 12(17):3787-90.,

Csakvari E ^{*}, **Kurunczi A** ^{*}, Hoyk Zs, Gyenes A, Naftolin F, Parducz A (2008)

Estradiol-induced synaptic remodeling of tyrosine hydroxylase immunopositive neurons in the rat arcuate nucleus.

Endocrinology. 149(8):4137-41.

^{*}E.Cs. and A.K. contributed equally to this article.

Kurunczi A, Hoyk Z, Czakvari E, Gyenes A, Parducz A (2008)

17β-Estradiol-induced remodeling of GABAergic axo-somatic synapses on estrogen receptor expressing neurons in the anteroventral periventricular nucleus of adult female rats.

Neuroscience. Nov 1. [Epub ahead of print]

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó közlemények:

Vezér T, Papp A, **Kurunczi A**, Párducz A, Návay M, Nagymajtényi L (2005)

Behavioral and neurotoxic effects seen during and after subchronic exposure of rats to organic mercury.

Environmental Toxicology and Pharmacology. 19 785-796

Parducz A, Hajszan T, Maclusky NJ, Hoyk Z, Czakvari E, **Kurunczi A**, Prange-Kiel J, Leranth C (2006)

Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: Neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids.

Neuroscience. 138(3):977-85.

Vezér T, **Kurunczi A**, Náray M, Papp A, Nagymajtényi L (2007)

Behavioral effects of subchronic inorganic manganese exposure in rats.

American Journal of Industrial Medicine. 50(11) 841-52

Sipos E, **Kurunczi A**, Kasza A., Horvath J, Felszeghy K, Laroche S, Toldi J, Párducz A, Penke B, Penke Z (2007)

β -Amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease.

Neuroscience. 147(1):28-36.

Horvát S, Fehér A, Wolburg H, Veszélka S, Tóth A, **Kurunczi A**, Balogh G, Kürti L, Erős I, Szabó-Révész P, Deli A. M (2008)

Sodium hyaluronate as a mucoadhesive component in nasal formulation enhances delivery of molecules to brain tissue.

Eur J Pharm Biopharm. Oct 26. [Epub ahead of print]

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A nemi hormonok organizáló és aktivizáló hatása	6
1.2. Különböző hypothalamikus magvak szinaptikus kapcsolatainak hormon indukált változásai	8
1.3. Az ösztrogén hatásának sejt és molekuláris szintű mechanizmusai	12
2. CÉLKITŰZÉSEK:	14
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
3.1. Kísérleti állatok és kezelések	15
3.2. Ösztrogén receptor preembedding immunhisztokémia	15
3.3. Tirozin hidroxiláz preembedding immunhisztokémia	16
3.4. Posztembedding immuncitokémia (immunogold GABA festés)	17
3.5. c-Fos immunhisztokémia	17
3.6. Morfometriai analízis	18
3.6.1. Fénymikroszkópos metszetek	18
3.6.2. A szinapszisok számának meghatározása	18
3.7. Az eredmények statisztikai értékelése	19
4. EREDMÉNYEK	20
4.1. 17 β -ösztradiol hatása az anteroventrális periventriculáris nucleus (AvPv) ösztrogén receptort expresszáló neuronjainak szinapszisaira	20
4.2. Ösztradiol indukált szinaptikus átrendeződés a nucleus arcuatus dopaminerg neuronjain	24
4.3. Korfüggő és nemi különbséget mutató változások a járulékos szaglógyomó c- Fos expressziójában	28
5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	32
5.1. Szinaptikus átrendeződés az anteroventrális periventriculáris nucleus-ban: az ER α és ER β szerepe	32
5.2. 17 β -ösztradiol-indukált változások a nucleus arcuatus tirozin hidroxilázt tartalmazó neuronjainak axo-szomatikus szinapszisaiban	34
5.3. Az életkor és az ösztrogén hatása a járulékos szaglógyomó c-Fos expressziójára	36
6. ÖSSZEFOGLALÁS	40
7. SUMMARY	44
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	48
9. IRODALOMJEGYZÉK	49

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC: avidin biotin komplex

AOB: járulékos szaglógyűrű

AvPv: anteroventralis periventriculáris mag

DA: dopamin

DAB: 3,3'-diamino benzidin

ER: ösztrogén receptor

ER-IR: ösztrogén receptor-immunreaktív

GABA: gamma-aminovajsav

GABA-IR: GABA immunreaktív

GAR: kecske anti-nyúl antitest

KO: knockout

MOB: fő szaglógyűrű

NGS: normál kecske szérum

PAP: peroxidáz-antiperoxidáz komplex

PB: foszfát puffer

PBS: foszfát puffer sóoldata

PRL: prolaktin

SNB: gerincvelő bulbocavernosus magja

TBS: tris puffer sóoldata

TIDA: tuberoinfundibuláris dopaminerg

TH: tirozin hidroxiláz

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidrokorrival

VMN: ventromediális mag

1. BEVEZETÉS

Ma már általánosan elfogadott az a nézet, hogy a központi idegrendszer az egyedfejlődés során különböző plasztikus változásokon megy át. Közel 100 évvel ezelőtt Ramón y Cajal (1911) már feltételezte, hogy felnőtt állatok neuronális összeköttetései az idegrendszer működése során változhatnak. Akkortájt nem fogadták el Cajal véleményét, és egészen a múlt század közepéig (Hebb 1949) úgy vélték, hogy a neuronális plaszticitás a már létező szinapszisok átviteli intenzitásában jelentkező viselkedés- és adaptáció-indukált változás, amelynek nincs morfológiai jele.

Azóta egyre több kísérlettel sikerült kimutatni, hogy valójában morfológiai változások zajlanak le az agyban, amelyek közreműködnek a külső és belső környezet körülményeinek átalakulásához való funkcionális alkalmazkodásban. Noha ezen neuroplasztikus változások mértéke és kiterjedése az egyedfejlődés során a legjelentősebb, a felnőtt egyedek agya is kiemelkedő strukturális és funkcionális kapacitással bír. Lényeges megemlíteni, hogy a plasztikus változásokat kiváltó okok is igen sokfélék lehetnek. Ilyen neuroplasztikus hatású tényezők közé sorolhatóak a nemi hormonok, amelyek erőteljesen befolyásolják az agyban lejátszódó sejtszintű és molekuláris folyamatokat. Az egyedfejlődés során a szteroidok jelenléte nélkülözhetetlen a nemi hormonokra érzékeny régiók kialakításában, melynek eredményeképp mind funkcionálisan, mind morfológiailag szexuálisan dimorf területek jönnek létre az agyban. Ugyanakkor felnőtt állatokban a nemi hormonok a strukturális és funkcionális változások aktiválásában is közreműködnek.

1.1. A nemi hormonok organizáló és aktivizáló hatása

Számos irodalmi adat igazolja a nemi hormonoknak a központi idegrendszer szexuál szteroidokra érzékeny területeire kifejtett organizáló és aktivizáló hatását (Arnold és Breedlove 1985). Az organizáló hatások tartósak és az egyedfejlődés során aktivizálódnak, főként a magzati-újszülöttkorban, amikor az ösztrogének és az aromatizálódó androgének befolyásolják az idegek fejlődését és az ideghálózatok kialakulását. Mindezek következtében a központi idegrendszer számos területe szexuálisan differenciálódik.

A nemi dimorfizmus első leírói közé tartozó Nottebohm és Arnold (1976) azt tapasztalták, hogy az énekesmadarak hangképzésért felelős agyi központjai

szignifikánsan nagyobbak hímekben mint nőstényekben. Hasonló strukturális különbségeket írtak le fürjek (Panzica és mtsai. 2001) és patkányok (Gorski és mtsai. 1978) mediális preoptikus magjában, valamint gyíkok anterior hypothalamus preoptikus régiójában (Crews és mtsai. 1990) is.

A nemi hormonok hatása patkányok gerincvelőjének bulbo cavernosus magjában (SNB) is megfigyelhető, hímekben ez a mag több neuronból épül fel. Ebben az esetben, a nemi hormonok organizáló szerepét alátámasztja az a tény, hogy nőstény állatok tesztoszteronnal való prenatális kezelése maszkulinizáló hatással volt az SNB neuronjainak mennyiségére (Breedlove és Arnold 1983). Mindezekén túl a strukturális szexuális dimorfizmus számos egyéb szerveződési szinten is manifesztálódhat. Így a nemeket illetően eltéréseket találhatunk a dendritikus strukturákban, az idegsejtek membránjának felépítésében és a neuronális kapcsolatokban egyaránt (Garcia-Segura és mtsai. 1994).

A szinaptikus mintázatokat érintő organizáló/fejlődési hatások tekintetében a ventromediális mag (VMN) ventrolaterális részének szinaptikus szerveződésében írtak le elsőként szexuális dimorfizmust. Nőstényekhez viszonyítva hímekben a dendrittűskéken és a dendrit törzsön lévő szinapszisok denzitása jelentősen nagyobb. A tűkeszinapszisok denzitásának mintázata a születést követő 5. napra alakul ki, és a posztnatális élet során mindvégig változatlan marad. Újszülött nőstények tesztoszteronnal történő kezelése megnövelte az axo-dendritikus szinapszisok számát, a hímekre jellemző mintázatot alakítva ki. Másrészt, újszülött hím egyedekben a tamoxifen injektálás szignifikánsan lecsökkentette a tűkeszinapszisok denzitását, így a felnőtt nőstényeknél megfigyelhető mintázat alakult ki (Pozzo Miller és Aoki 1991).

Az utóbbi években egyre több kutatás foglalkozott a nemi hormonok aktivizáló hatásával. Ezek a hatások átmenetiek és az aktuális hormonszintnek megfelelően változnak. Az aktivizáló hatások legjellegzetesebb tulajdonsága az, hogy nemcsak az egyedfejlődés, hanem a felnőtt élet során is jelentkeznek, az agyi működés majdnem minden aspektusát befolyásolva. Az egyre szaporodó eredmények ellenére is épp csak bepillantást nyerhetünk a gonadális szteroid indukált neuroplaszticitás hatásmechanizmusába, hiszen nagyon kevés információ áll a rendelkezésünkre a szinaptikus események időtartamát illetően.

Korábban úgy vélték, hogy a nemi hormonok a már kialakult neuronális kapcsolatok aktivitásának megváltoztatásával módosítják a felnőttekre jellemző viselkedést. Ez az oka annak, amiért a korai tanulmányok a neuropeptidok és a

neurotranszmitterek szintézisére, valamint a receptorok számának megváltozására fókuszáltak (Cardinali és Vacas 1978; Romano és mtsai. 1989). Ugyanakkor egyre több adat igazolja, hogy a kifejlődött agyat érő hormonális hatások morfológiai változásokat is előidéznak. Például, DeVoogd és Nottebohm (1981) kimutatta, hogy ovariectomizált felnőtt kanárik nemi hormonokkal történő kezelése dendritikus növekedést indukált bizonyos agyi régiókban. Hím patkányok kasztrálásával előidézett androgén szint pedig drámai strukturális változásokat eredményezett (rövidebb dendritnyúlványok és zsugorodott perikarion) a motoneuronok androgénekre érzékeny csoportjában, amely a hímek párzási funkcióiban vesz részt. Ezek a változások visszafordíthatóak, amennyiben az állatokat androgénnel kezelik. Kurz és munkatársai (1986) arra a következtetésre jutottak, hogy felnőtt állatok androgén szintjének fiziológiás ingadozása szoros kapcsolatban áll ezen neuronok strukturális és funkcionális változásával.

1.2. Különböző hypothalamikus magvak szinaptikus kapcsolatainak hormon indukált változásai

Az elmúlt évek kutatásainak köszönhetően az az általános nézet terjedt el, hogy a nemi hormonok képesek szinaptikus plaszticitást, azaz strukturális átrendeződést indukálni az idegrendszer bizonyos részeiben. A nemi hormonok szaporodással összefüggő szerepének következtében a szinaptikus változások főként azon agyi régiókban játszódnak le, amelyek részt vesznek a szaporodás és a neuroendokrin események idegi szabályozásában. Így a kezdeti kutatások a hypothalamus-ra, az agy egyik fő vegetatív központjára irányultak. Az akkori tanulmányok szerint a magnocelluláris oxitocinerg neuronok és asztrocitáik funkciójában a laktáció előidézte átalakulásokat ezen neuronok szinaptikus bemeneteiben bekövetkező változások kísérik: a szinapszisok száma születéskor nő, az anyától való elválasztást követően pedig csökken. (Theodosia és mtsai. 1981; Theodosia és Poulain 1984). Az egyik legrészletesebb tanulmány (Gies és Theodosia 1994) rávilágít arra, hogy a hormonális környezet változása nem minden szinapszisa hat, ugyanis a GABA immunreaktív (GABA-IR) végződések, ezek közül is főleg azok, amelyek a szómákon végződnek, szignifikánsan nagyobb számban fordulnak elő laktáló patkányokban. A szinapszisok számában bekövetkező emelkedés

legnyilvánvalóbban a szupraoptikus mag középső és hátulsó régiójában figyelhető meg.

Calizo és Flanagan-Cato (2000) kimutatta, hogy ovariectomizált patkányok két napig tartó ösztadiol benzoáttal való kezelése 48%-osan megnövelte a ventromediális mag ventrolaterális részében a dendrittűskék előfordulásának a gyakoriságát, de nem volt hatással a mag dorzális részén elhelyezkedő tűskeszinasziszok sűrűségére. A VMN idegsejtjeinek primer dendritjei eltérő módon reagálnak ösztrogén hatására: az ösztrogén kezelés kétszeresére emelte a tűskeszinasziszok számát a rövid primer dendriteken, de nem befolyásolta a hosszú primer dendritek tűskeszinasziszainak sűrűségét.

A szinaptikus átrendeződéssel kapcsolatos kísérleti adatok nagy része a nucleus arcuatus-on végzett vizsgálatokból származik. Arai és Matsumoto (1978) bizonyította, hogy nőstény patkányok posztnatális fejlődése alatt történő ösztrogén kezelés hatással van a szinapszisok képződésére. Kapcsolataitól megfosztott arcuatus-ban három hetes ösztadiol-benzoát kezelés mérsékelte az axo-szomatikus szinapszisok deafferentáció indukált csökkenését (Matsumoto és Arai 1979). Ezek a kezdeti eredmények egyértelműen igazolják, hogy a nucleus arcuatus idegsejtjeinek plasztikus képessége ösztadiol kezelés hatására szignifikánsan fokozódik (Matsumoto és Arai 1981). Az arcuatus szinapsziszai fázisos átrendeződésen mennek keresztül, amely szoros összefüggést mutat a nemi ciklus során tapasztalható hormonkoncentráció változásával (Olmos és mtsai. 1989). A nucleus arcuatus axo-szomatikus szinapsziszainak száma jelentősen csökken a proösztroz reggele és délutánja között, és változatlanul alacsony szinten marad az ösztroz reggeléig, majd csak a metösztroz/diösztroz követően éri el újra a kezdeti szintet. Közismert, hogy a vérben keringő ösztadiol szintjének csúcsát a proösztroz reggelén éri el, ami azt sugallja, hogy az ösztadiolnak serkentő hatása lehet ezekre az eseményekre. A hipotézis valószínűségét igazolják Garcia-Segura és munkatársai által végzett kísérletek (Garcia-Segura és mtsai. 1986), valamint saját vizsgálataink a különböző típusú szinapsziszok számának morfológiai elemzése alapján szintén erre utalnak (Csakvari és mtsai. 2007). Felnőtt, szabályosan ciklizáló patkányok esetében a szinaptikus átrendeződés a hormonszint változásával szinkronban zajlott le és ugyanolyan jellegű volt, mint ovariectomizált és 17β -ösztadiollal kezelt állatokban.

Egyre több adat támasztja alá, hogy a nucleus arcuatus-ban az ösztadiol előidézte szinaptikus plaszticitás specifikus, mert csak bizonyos típusú szinapszis

reagál a hormon hatására (Parducz és mtsai. 1993). Elektronmikroszkópos szinten végzett kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok igazolják, hogy ovariectomizált patkányok nucleus arcuatusá-ban az axo-szomatikus végződések többsége GABA immunoreaktív. 17 β -ösztradiollal történő egyszeri kezelés a GABA-IR axo-szomatikus szinapszisok számának szignifikáns csökkenését eredményezte. Ezzel szemben, a hormonkezelés nem befolyásolta az immunnegatív axo-szomatikus szinapszisok számát. Ezek az adatok egyértelműen mutatják, hogy az ösztadiol fiziológiás koncentrációja megváltoztatja a nucleus arcuatushoz futó gátló hatású GABAerg axo-szomatikus bemenetek mennyiségét. Az utóbbi időkben csoportunk munkatársai kimutatták (Parducz és mtsai. 2002), hogy az ösztadiol kezelés nem okoz változást az arcuatus axo-dendritikus szinapszisainak számában, bár a serkentő tüskeszinapszisok térfogati sűrűsége szignifikánsan emelkedett a kezelést követően.

Ezen túlmenően nagyon lényeges kérdés, hogy a hormon hatásának preszinaptikus szinten megnyilvánuló specifikus jellege mellett befolyásolják-e a hatást a posztszinaptikus, azaz a célsejtek. Az első ilyen irányú kísérletek egyértelműen jelezték, hogy a 17 β -ösztadiol hatása nemcsak a pre-, hanem a posztszinaptikus sejtektől is függ. A retrográd jelölő Fluorogold alkalmazásával megállapítottuk, hogy a nucleus arcuatus ún. "hypophyseotrop" neuronjai, melyek projekcióikat az eminencia mediana-ba küldik, kevesebb axo-szomatikus bemenetet kapnak, mint a nem jelölt neuronok. A magon belül a 17 β -ösztadiol indukált szinaptikus átrendeződés a neuronok ezen (az eminencia mediana-ba vetülő) alpopulációját érinti, ahogy azt az axo-szomatikus szinapszisok számának csökkenése bizonyítja (Parducz és mtsai. 2003).

Számos anatómiai és élettani adat valószínűsíti, hogy ezek az általunk Fluorogold technikával azonosított "hypophyseotrop" sejtek dopaminerg neuronok, és a neuroendokrin szabályozásban igen fontos tuberoinfundibuláris dopaminerg (TIDA) rendszer részei. A dopaminerg neuronok immunhisztokémiai azonosítása a dopamin szintézisben szerepet játszó enzim, a tirozin hidroxiláz (TH) kimutatásával történik és korábbi tanulmányok azt is igazolták, hogy a nucleus arcuatusban lévő GABAerg végződések kiterjedt szinaptikus kapcsolatot létesítenek ezekkel a TH tartalmú sejtekkel (van den Pol 1986; Decavel és van den Pol 1992). Ez az anatómiai szerveződés alapja annak, hogy a GABAerg neuronok képesek közvetlenül befolyásolni ezen tuberoinfundibuláris dopaminerg neuronok aktivitását, és a dopamin (DA) felszabadulását a TIDA axonvégződésekből. Ugyanakkor a TIDA neuronok

aktivitására az ösztadiol is hatással van hím és nőtény állatokban egyaránt (Shieh és Pan 1996). Logikus volt tehát feltételezni, hogy a 17β -ösztadiol befolyásolja a nucleus arcuatus TH-immunoreaktív neuronjainak szinaptikus kapcsolatait, ennek tanulmányozása volt egyik célkitűzésünk.

Az elmúlt évek során megfogalmazódott egy igen fontos kérdés: vajon a nemi hormonok által kiváltott strukturális szinaptikus átrendeződés összefügg-e a neuronális aktivitás változásával. A legkézenfekvőbb magyarázat az, hogy az axoszomatikus gátló szinapszisok számának csökkenése, és ezzel egyidőben a dendrittüskéken levő serkentő szinapszisok denzitásának emelkedése együttesen vezet a nucleus arcuatus neuronális aktivitásának erősödéséhez (Parducz és mtsai. 2002). Elektrofiziológiai adatokkal sikerült alátámasztani, hogy az ösztadiol valóban serkenti a nucleus arcuatus bizonyos sejtcsoportjaiban lévő neuronok tüzelési frekvenciáját. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét is, hogy az ösztrogén által előidézett morfológiai változások párhuzamba hozhatóak az idegsejtek aktivitásának változásával.

Noha általánosan elfogadott tény, hogy a hormon indukált szinaptikus átrendeződés jelentős szerepet játszik a központi idegrendszer működésével kapcsolatos folyamatokban, viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a strukturális szinaptikus változások időbeli lefolyását illetően. A korábbi tanulmányok magára a jelenségre és annak hatására összpontosítottak, amit a hosszútávú hormonkezelést követően figyeltek meg. Az a tény, hogy a szinaptikus változások összefüggésben vannak az ösztroz ciklus alatti hormonális változásokkal, felveti annak a lehetőségét, hogy a morfológiai változások inkább órákon belül, mintsem napokon keresztül zajlanak le, de ezt közvetlen kísérleti bizonyítékokkal még nem sikerült igazolni. Elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei világosan mutatják, hogy efféle szinaptikus átrendeződés kevesebb mint egy órán belül lejátszódhat. Kis és munkatársai (1999) az arcuatus idegsejtjeinek spontán aktivitásának szignifikáns emelkedését regisztrálták 25 perccel a 17β -ösztadiol beadását követően. A szerzők in situ preparátumot használtak, vagyis a kísérletek során a vizsgált sejthez tartozó összes szinaptikus kapcsolat intakt maradt, lehetővé téve a kutatók számára, hogy végigkövethessék az azonos egységen belüli hormonális hatások alakulását. Az ösztadiol beadását követő 25 percen belül észlelt fokozódó neuronális aktivitás az arcuatus neuronjaihoz futó gátló szinaptikus bemenetek csökkenésének következménye lehet (Kis és mtsai. 1999).

1.3. Az ösztrogén hatásának sejt és molekuláris szintű mechanizmusai

A gonádok felől érkező ösztradiol szignál a sejtmagban lévő receptorokon keresztül fejt ki transzkripció szabályozására gyakorolt hatását. Az intracelluláris ösztrogén receptorok (ER) homo-, ill. heterodimerekké rendeződése után a DNS ösztrogénre érzékeny szakaszával (Estrogen Responsive Element) kölcsönhatásba lépve célgénjeik expresszióját szabályozzák (Tsai és O'Malley 1994; Sanchez és mtsai. 2002). Jelenleg a magi ösztrogén receptorok két altípusa ismert, a klasszikus ER α és a nemrég felfedezett ER β , génjeik nem azonos kromoszómán lokalizálódnak. Az alfa és a béta ösztrogén receptor DNS-kötő doménje nagyfokú homológiát mutat (97 %), míg a ligand kötő domén csak 59 %-ban tartalmaz homológ régiókat (Kuiper és mtsai. 1996).

Mindkét típusú receptor az agy számos területén detektálható, expressziójuk szintje területenként változó és nemi különbséget mutat (Orikasa és mtsai. 2002), ami utalhat az ösztradiol egyes receptorokon keresztül érvényesülő különböző hatásaira (Dubal és mtsai. 2001; Sanchez és mtsai. 2002). Ugyanazon neuronon belüli ER α és ER β jelenléte heterodimerek képződéséhez vezethet, ami módosíthatja a transzkripció specifikitását (Ogawa és mtsai. 1998), és a receptorok egymáshoz viszonyított arányától függően az ösztrogén által kiváltott eltérő hatások megjelenését eredményezheti (Hall és McDonnell 1999).

ER α vagy β hiánya eltérő módon hat a szaporodási viselkedések kialakulására. ER β knockout (KO) nőstény egerek subfertilisek (Krege és mtsai. 1998), ugyanakkor mind a nőstény, mind a hím ER α KO egerek elvesztik termékenységüket (Lubahn és mtsai. 1993). Mindezek arra engednek következtetni, hogy mindkét típusú receptornak szerepe lehet a Hypothalamus-Hypophysis-Gonádok (HPG) által alkotott tengely szabályozásában (Temple és mtsai. 2003).

Nagyon kevés adatunk van az ösztrogén receptoroknak a 17 β -ösztradiol-indukálta szinapszis átrendeződésben játszott szerepéről. Ezt kívántuk tanulmányozni a hypothalamus anteroventralis periventrikuláris magjában (AvPv), amely szenzoros és hormonális információk integrációs központjaként a gonadotropin szekréció neuronális szinten megvalósuló szabályozásért felelős (Simerly 1998). Ez a mag bőségesen tartalmaz olyan neuronokat, melyek ösztrogén (Langub, Jr. és mtsai. 1991;

Langub, Jr. és Watson, Jr. 1992b; Watson, Jr. és mtsai. 1994) vagy progeszteron receptorokat expresszálnak (Simerly 1993).

Ciklizáló nőstény patkányok anteroventralis periventrikuláris magjában Langub és munkatársai (1994) 39%-os axo-szomatikus szinapszis szám növekedést tapasztaltak proösztroz és ösztroz ideje alatt. A következő 24 órában a szinapszisok száma 22%-kal csökkent, míg az ovariectomizálás eredményeként megnőtt a magon belüli axo-szomatikus szinapszisok száma. Szintén megfigyelték, hogy az ösztrogén receptor-immunreaktív (ER-IR) neuronok szignifikánsan több szinaptikus bemenetet kapnak proösztroz és ösztroz során, mint a nem-ER-IR sejtek. Arra a következtetésre jutottak, hogy az ER-pozitív és negatív sejtek eltérő módon innerváltak. A Langub féle vizsgálatok idején még nem tudtuk, hogy az AvPv-ben ER α -t és ER β -t expresszálo sejtek egyaránt előfordulnak, így ebben a magban az általunk alkalmazott kettős jelölést használva tanulmányozható mindkét ösztrogén receptor szerepe a 17 β -ösztrodiol által kiváltott plasztikus szinaptikus válaszokban.

Az ösztrogén indukált plaszticitás pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, de úgy tűnik, hogy intracelluláris szignálok keresztül valósul meg. Ilyen szempontból, az ösztrogén is kapcsolatba hozható az agyi c-fos gén szabályozásával (Priest és Roberts 2000). Ez a proto-onkogén a közvetlen korai gének családjába tartozik, és transzkripciós aktivátorként különféle szignál transzdukciós útvonalakon keresztül fejti ki hatását (Seternes és mtsai. 1998). A proto-onkogének közé tartozó c-fos a funkcionális anatómiai térképezés leggyakrabban használt eszköze. Alkalmazásával lehetőség nyílik a különféle stimulusokra aktiválódó sejtek azonosítására (Greenberg és Ziff 1984; Sagar és mtsai. 1988). Másrészt a c-fos és a jun család tagjai dimerizálódva transzkripciós faktorokat képeznek, amelyek a DNS-hez kötődve célgének expressziójára hatva tartós változásokat idéznek elő a sejtek fenotípusában (Sheng és Greenberg 1990).

Fiziológiás körülmények között a c-fos mRNS és fehérje szintje nagyon alacsony (Hughes és mtsai. 1992). Azonban akut hatásokra a c-fos mRNS néhány percen belül indukálódik és 30-60 perc múlva eléri expressziója csúcsát. A c-Fos fehérje maximális szintjét a kezelést követő egy-három órán belül éri el, majd négy-hat óra elteltével rohamosan eltűnik a sejtmagból (Sonnenberg és mtsai. 1989; Chan és mtsai. 1993). Általánosságban elmondható, hogy a Fos indukciója tükrözi a neuronok működési aktivitását (Sagar és mtsai. 1988a; Duncan és mtsai. 1993). Igen sokféle hatás/faktor képes a c-fos expresszió indukálására: neurotrofikus faktorok,

neurotranszmitterek (Kovacs 1998a), depolarizáció, Ca^{2+} influx növekedése és az intracelluláris/intranukleáris Ca^{2+} szint emelkedése, továbbá hő, mechanikai és kémiai stimulusok (Lima és mtsai. 1993), hormonhatás, és stressz (Kovacs 1998b).

Wang és munkatársai (2004) kimutatták, hogy az ösztadiol hatással van a főemlősök prefrontális kérgében lévő c-fos expressziójának mértékére. Továbbá a hypothalamus-ban a Fos expresziójának szintje szoros kapcsolatban állt az ösztadiol koncentrációjával (Peterfi és mtsai. 2004). Ovariectomia következtében fokozódott a gerincvelő hátsó szarvának perifériás stimulusra való érzékenysége és megváltozott a Fos protein szintje (Zhao és mtsai. 2005). Az ösztrogén kezelést követő 4 órán belül a c-Fos immunreaktív sejtek számának növekedését írták le. A c-Fos fehérje szintén érintett a neuronális plaszticitásban, és a jelenlegi adatok alapján elmondható, hogy a c-Fos immunreaktív sejtek száma a kor előrehaladtával csökken az agy és a gerincvelő bizonyos területeiben (Kitraki és mtsai. 1993; Kim és mtsai. 1999).

A c-Fos-szal kapcsolatos vizsgálataink során a korai gének hormon által történő aktiválódásának időfüggését és esetleges nemi különbségeit kívántuk tanulmányozni.

2. CÉLKITŰZÉSEK:

Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az ösztadiol által indukált szinapszis átrendeződés specifikus, a plasztikus változások nem azonos mértékben érintik a GABAerg és nem GABAerg szinapszisokat. Az értekezésben összefoglalt vizsgálatainkban további adatokat kívántunk szerezni azokról a különböző szintű mechanizmusokról, melyek a hormon hatásának specifikus jellegét befolyásolják.

Konkrét kérdések:

1. Van-e összefüggés a különböző típusú ösztrogén receptorok ($\text{ER}\alpha$ és $\text{ER}\beta$) jelenléte és az ösztadiol által kiváltott plasztikus szinaptikus válaszok között? Milyen típusú ösztrogén receptor közvetítheti a hormon szinaptikus plaszticitást befolyásoló hatását?
2. Van-e szerepe a hormonálisan indukált szinaptikus átrendeződésben a posztzinaptikus neuronoknak? Különbözik-e a nucleus arcuatus dopaminerg neuron populációjának (TIDA rendszer) beidegzése és szinaptikus kapcsolatainak plasztikus változása a mag többi neuronjától?

3. Van-e nemi különbség az intracelluláris szignalizáció szempontjából fontos c-Fos expressziójában a szexuális viselkedésformák szabályozásában kiemelt szerepet játszó és nagyfokú plaszticitást mutató járulékos szaglógumóban?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és kezelések

A vizsgálatokhoz Sprague Dawley, CFY és Wistar patkányokat használtunk, melyeket standard laboratóriumi körülmények között tartottunk (12:12 órás megvilágítási ciklus, szabadon hozzáférhető normál patkánytáp és víz). A kezelés teljes időtartama alatt, illetve az állatok perfundálás előtti altatásakor különös figyelmet fordítottunk az állatokat érő stresszhatások minimalizálására, valamint az előírt állatvédelmi törvények betartására.

1.a) Az életkor-függő plasztikus változások tanulmányozásához kezeletlen kéthetes (juvenilis csoport), három hónapos (felnőtt csoport) vagy 24 hónapos (idős csoport) hím és nőstény állatokat használtunk (n=4-5/csoport, nemenként).

1.b) Az ösztrogén hatásának tanulmányozásához két hónapos patkányok gonádjait nembutal érzéstelenítés alatt eltávolítottuk, majd egy hónapos túlélést követően az állatok egyik csoportját szezám olajban oldott 17 β -ösztradiollal (Sigma Chemical Co., St. Louis) kezeltük (45-100 $\mu\text{g/kg}$ testsúly), míg a kontroll csoportot csak a oldószerrel injektáltuk. Az egyes csoportok 4-6 állatot tartalmaztak.

3.2. Ösztrogén receptor preembedding immunhisztokémia

A nembutállal altatott ovariectomizált, ill. a műtét előtti napon 17 β -ösztradiollal kezelt ovariectomizált állatokat 0,1 M foszfát-pufferben (pH=7,4) oldott 1-1%-os paraformaldehid-glutáraldehid oldattal szíven keresztül perfundáltuk. Az eltávolított agyakat három órán keresztül utófixáltuk glutáraldehid mentes fixálóban. A mosást követően az AvPv területét magába foglaló 50 μm vastag metszeteket készítettünk vibratómmal.

Az ösztrogén receptor immunhisztokémiához a hidrogén peroxidos előkezelést 30%-os cukor oldattal történő inkubálás követte. A krioprotekciót követően a mintákat folyékony nitrogénben háromszor megfagyasztottuk. Az aspecifikus kötéseket 20% normál kecske szérummal (Normal Goat Serum, Sigma) blokkoltuk, majd 1:1000 (ER-alfa, Santa Cruz Biotechnology), ill. 1:500 (ER-béta, Zymed Laboratories Inc.) arányban hígított poliklonális antitesttel 48 órán át 4°C-on inkubáltuk a metszeteket. Másodlagos antitestként biotinnal konjugált anti nyúl IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis) 1:500 hígítását alkalmaztuk, majd avidin-biotin-komplex-szel (VECTASTAIN ABC rendszer, Vector Laboratories) kezeltük. A hívásnál Langub és Watson (1992) által továbbfejlesztett 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidrokoriddal (TMB) történő módszer szerint jártunk el (Norgren, Jr. és Lehman 1989). A szekunder antitesttel való reakciót követően a mintákat kétszer szobahőmérsékletű PBS-sel mostuk, majd háromszor jéghideg 0,1 M PBS-sel, pH=6,0. A mosás után a metszeteket TMB oldatba (48,78 ml 0.25%-os molibdén sav 0,1 M PBS, pH=6,0 oldatban hígítva; 2,5 mg TMB 1,25 ml 100%-os etanolban oldva; 3 µl 30%-os hidrogén peroxid) helyeztük nyolc percre. A TMB reakciót DAB/kobalt acetát oldattal stabilizáltuk 2-3 percen keresztül. A stabilizáló oldat 25 ml TBS pufferben oldott 0,05%-os DAB és 0,625 ml 1%-os kobalt acetát, valamint 3 µl 30%-os hidrogén peroxid elegyét tartalmazta. A reakciót PBS-ben (pH=7,2) történő mosással állítottuk le. Ezt követően a metszeteket az elektronmikroszkópos vizsgálat céljából a később leírt eljárásoknak megfelelően (beágyazás, ultravékony metszet készítés, GABA immunfestés) dolgoztuk fel.

3.3. Tirozin hidroxiláz preembedding immunhisztokémia

Az állatok 250 ml 1-1%-os glutáraldehid és paraformaldehid oldattal történő perfundálását követően az agyakat glutáraldehid mentes fixálóban utófixáltuk három órán keresztül. Vibratómmal 50 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk a nucleus arcuatus középső (mediális) részéből. A tirozin hidroxiláz immunfestéshez a mintákat elsőként 20%-os normál kecske szérummal kezeltük fél óráig a nonspecifikus kötődések blokkolása érdekében. A blokkolást követően a metszeteket 1:1000-es hígítású nyúl poliklonális anti-TH antitestet tartalmazó oldattal reagáltattuk egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten. A mosást követően a mintákat két órán keresztül inkubáltuk 1:1000-es hígítású kecske-anti-nyúl IgG (GAR, Sigma

Laboratories) oldatban. Ezt követően 1:1000-es hígítású peroxidáz-antiperoxidáz komplex (PAP) oldatban inkubáltuk őket két óráig, majd a rutin módon 3,3'-diamino benzidinnel (DAB) és hidrogén peroxiddal hívtuk elő.

3.4. Posztembedding immuncitokémia (immunogold GABA festés)

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz az előzetesen immunfestett metszeteket (TH, ER α , ER β) 1%-os OsO₄ oldattal ozmifikáltuk 30 percen keresztül. A mintákat dehidratáltuk, Araldite gyantába ágyasztuk és Liquid-release-zel bevont tárgylemezek közé téve termosztátba helyeztük. A gyanta polimerizálása után ultravékony sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket Formvarral bevont egylyukú arany gridekre vettünk fel.

A posztembedding GABA immunhisztokémiát a Somogyi és Hodgson-féle (Somogyi és Hodgson 1985) módszer módosított változata (Parducz és mtsai. 1993) alapján végeztük. A metszetekből a műgyantát és az ozmiumot hét percig tartó 1% perjódsvavas, illetve Na-metaperjódátos maratással távolítottuk el. Az aspecifikus kötések blokkolására 1:5 hígítású normál kecskesavót (Sigma Laboratories) használtunk (30 perc). A primer antitestet 1:500 arányban hígítottuk 100 mM TRIS, 100 mM PBS 10% kecske szérum és 0,1% Triton X-100 összetételű oldatban. A metszeteket szobahőmérsékleten két órán át inkubáltuk az anti-GABA oldattal, majd a mosás után újabb két órán keresztül a másodlagos antitesttel (15 nm-es arany szemcsékkel jelölt kecskében termelt anti nyúl IgG, 1:20, Janssen, Aurion). A metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk, majd Zeiss EM 902 elektronmikroszkóppal analizáltuk.

3.5. c-Fos immunhisztokémia

Az állatokat nembutalos altatás alatt transzkardiálisan perfundáltuk 0,1 M foszfát pufferben oldott 4%-os paraformaldehid oldattal (pH=7,4). Az agyakat eltávolítottuk és 24 órán keresztül ugyanilyen fixálóban utófixáltuk. Vibratómmal 50 μ m vastag szagittális metszeteket készítettünk a bulbus olfactorius járulékos szaglógyumót tartalmazó régiójából. A rutin c-Fos festésnek megfelelően a szabadon úszó metszeteket hidrogén-peroxidos oldattal kezeltük 30 percen keresztül, majd 1:20 000 arányban hígított poliklonális nyúl anti-patkány c-Fos (Santa Cruz

Biotechnology, CA) antitesttel 48 órán át 4 °C-on inkubáltuk. Másodlagos antitestként biotinnal konjugált anti nyúl IgG (Sigma Laboratories) 1:500 hígítását alkalmaztuk, majd avidin-biotin-komplex-szel (VECTASTAIN ABC rendszer, Vector Laboratories) kezeltük. Az előhívást (DAB), nikkel kloridot és hidrogén peroxidot tartalmazó oldattal végeztük el. A metszeteket zselatinnal bevont tárgylemezekre húztuk, dehidráltuk és Entellannal (Merck, Darmstadt, Germany) fedtük.

3.6. Morfometriai analízis

3.6.1. Fénymikroszkópos metszetek

A metszeteket Zeiss-Jenalumar fénymikroszkóppal tanulmányoztuk és a számolást digitális képanalízissel végeztük el (Image-Pro-Plus software). A c-Fos immunreaktív sejteket az optikai diszektor módszer segítségével határoztuk meg. Állatonként öt metszettel dolgoztunk, és a járulékos szaglógumó három különböző területén végeztük el a sejtszámlálást. Mindhárom terület egyaránt tartalmazta a glomeruláris, a mitrális és a granuláris sejtek rétegét. A statisztikai kiértékelést Student-féle t próba segítségével végeztük el.

3.6.2. A szinapszisok számának meghatározása

Az elektronmikroszkópos metszeten a szinapszisok sűrűségét a diszektor módszerrel (Sterio 1984) állapítottuk meg. 90 nm vastag sorozatmetszeteket használva meghatároztuk a szinapszisok átlagos kivetített magasságát az axoszomatikus szinapszisok esetében. Ennek az értéknek a 30%-át tekintettük a diszektor magasságának. Egymástól kb. 270 nm távolságra lévő párhuzamos metszeten 12-15 perikarion szinapszisait számoltuk meg. Szinapszisként azt a struktúrát tekintettük, amely posztszinaptikus megvastagodást és legalább három szinaptikus vezikulát tartalmazott. A szinapszisok számát a

$$N_v = \Sigma Q_{-} / V_{dis}$$

képlet alapján számoltuk ki, ahol

ΣQ_{-} jelenti azon szinapszisok számát, melyek az egyik metszeten megtalálhatóak, ugyanakkor a vele párhuzamos metszeten már nem.

Vdis a diszektor térfogata, mely az analizált perikarion területe és a két párhuzamos metszet közti távolság (diszektor magassága) szorzata.

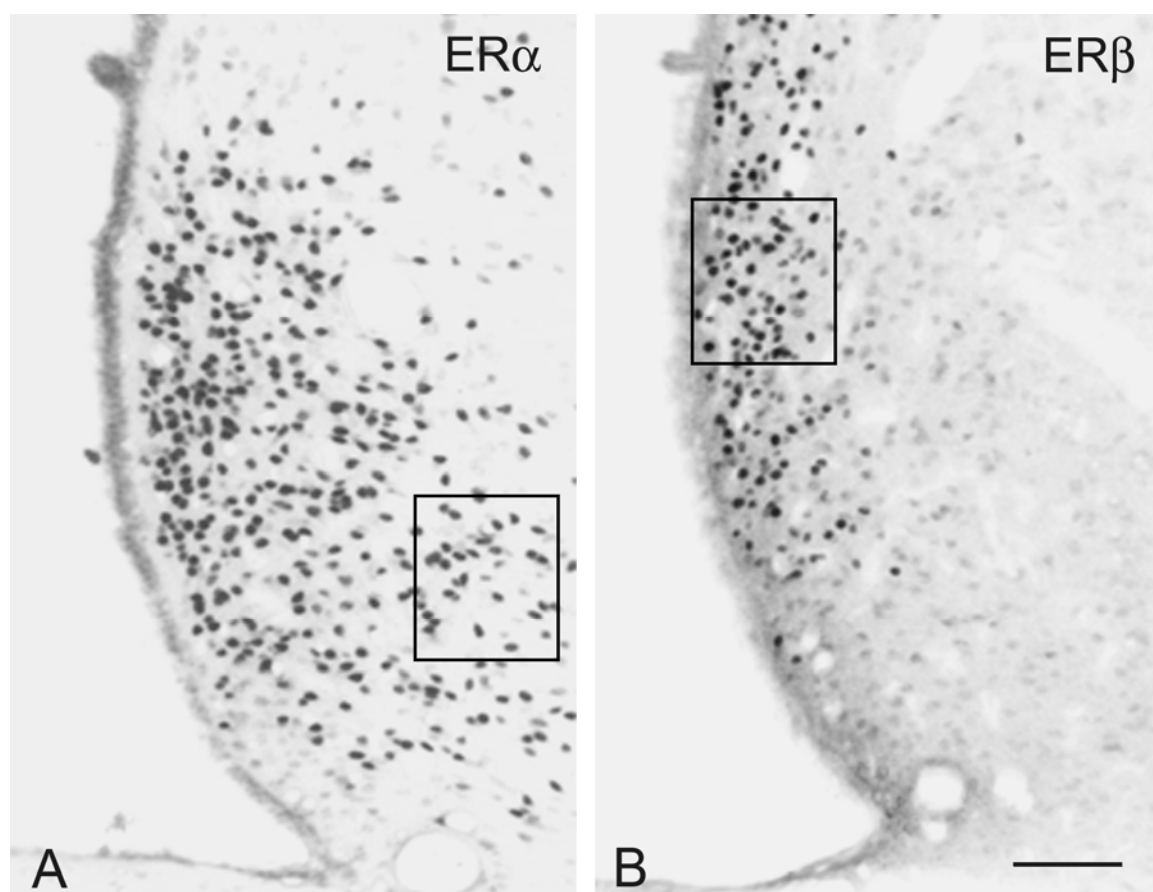
3.7. Az eredmények statisztikai értékelése

Az egyes kísérleti csoportok hat állatból álltak és minden állatból három-három blokkot dolgoztunk fel. Az azonos állatokból származó blokkok eredményeit összesítettük, mivel nem volt különbség az adott állathoz tartozó blokkok eredményei között. A normál eloszlást a Kolmogorov próba segítségével ellenőriztük. Ezt követően az átlagok összehasonlításához a Student-féle t próbát alkalmaztuk és $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns eltérésnek.

4. EREDMÉNYEK

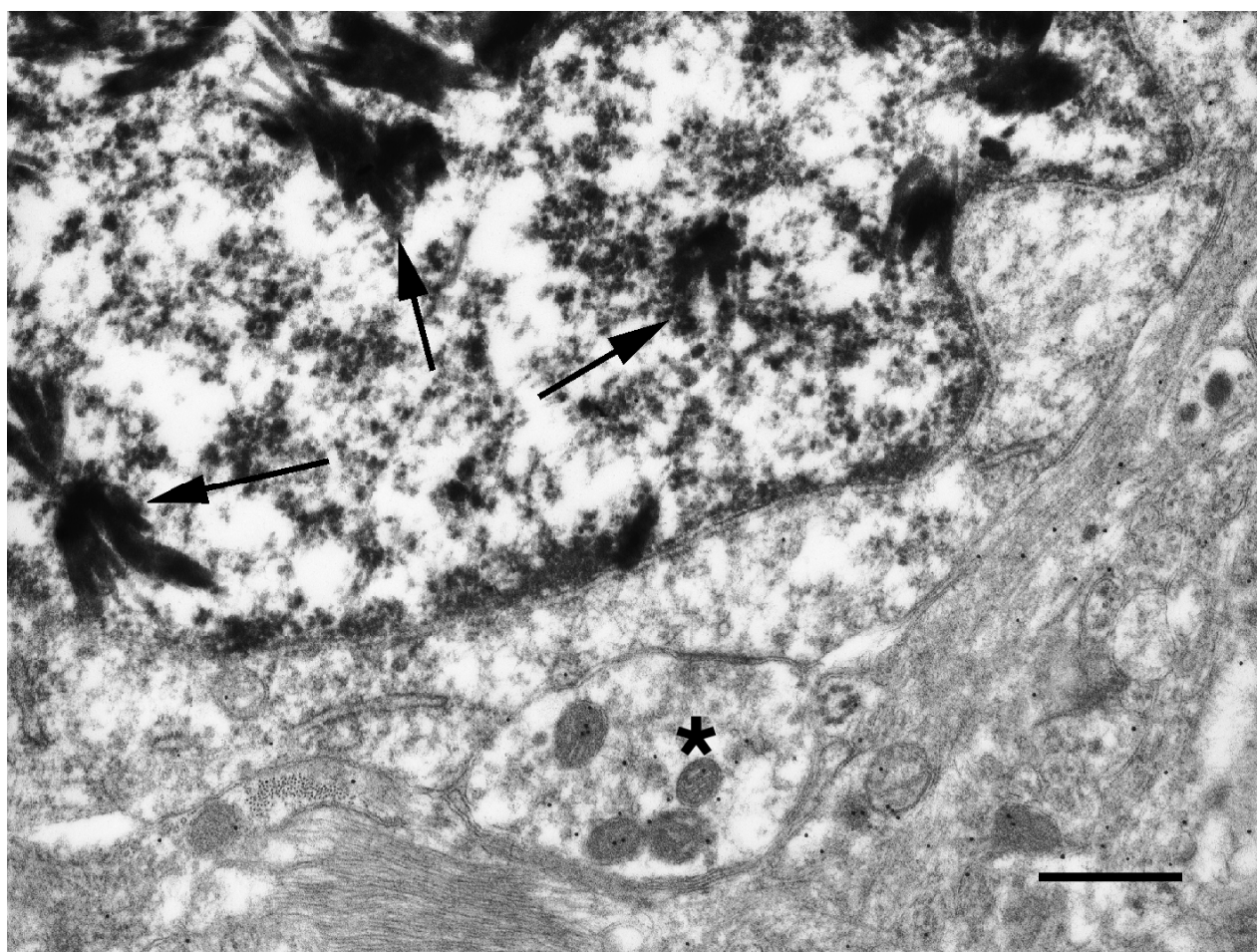
4.1. 17 β -ösztradiol hatása az anteroventrális periventriculáris nucleus (AvPv) ösztrogén receptort expresszáló neuronjainak szinapszisaira

Az irodalmi adatokkal megegyezően (Langub, Jr. és mtsai. 1994; Simerly 1998; Orikasa és mtsai. 2002) saját adataink is azt mutatják, hogy az AvPv jelentős mennyiségben tartalmaz ösztrogén receptort expresszáló neuronokat. Az alfa és béta típusú ösztrogén receptorok eloszlása nem homogén: míg az ER α immunpozitív sejtek a mag minden részén kimutathatóak, addig az ER β -pozitív sejtek csak az AvPv középső zónájában detektálhatóak. A sejtek elhelyezkedésének másik érdekessége az, hogy ER β -t expresszáló neuronok csaknem kizárólag az agykamra közelében találhatók (1. ábra).



1. ábra. ER α és ER β immunoreaktív sejtek ovariectomizált patkány AvPv-jéből. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok és morfológiai mérések a négyszögekkel határolt területeken történtek. Skála: 0,5 mm.

Ennek megfelelően elektronmikroszkópos tanulmányainkhoz az AvPv rostrális részéről származó metszeteket használtunk, ahol a béta-típusú ösztrogén receptort expresszáló sejtek jól körülhatárolható módon helyezkednek el a kamrát határoló endimális rétegtől 50 μm -es sávban, míg ettől laterálisan csak ER α immunreaktív sejtek fordulnak elő. Ahogy azt a fénymikroszkópos ábra mutatja, a szinaptikus denzitás morfológiai meghatározásához két területet választottunk ki. Orikasa és munkatársai (2002) szerint a kétféle ösztrogén receptor nagyfokú kolokalizációt (~83%) mutat, ezáltal a B területől származó neuronok feltehetően mindkét receptort expresszáló sejtek csoportját tartalmazzák, szemben az A terület sejtjeivel, amelyek kizárólag ER α tartalmazzák.

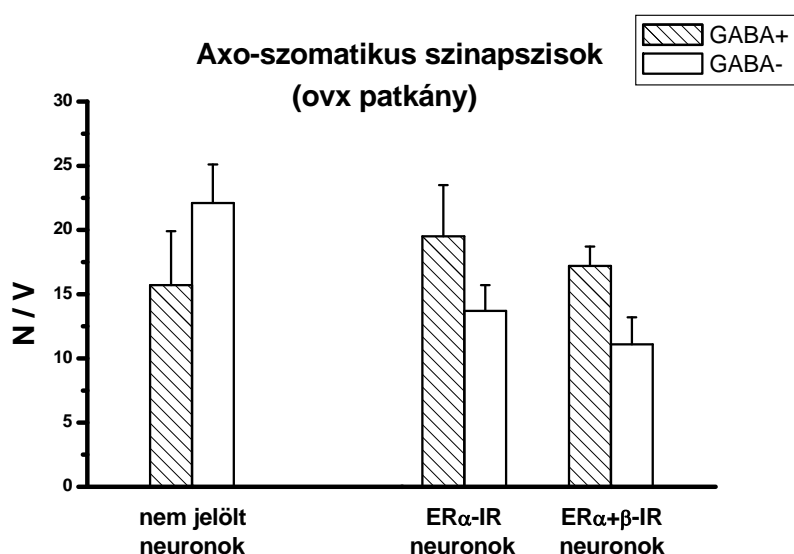


2. ábra. ER β immunoreaktív AvPv neuron elektronmikroszkópos felvétele. A nyilak a jellegzetes TMB kristályokat jelzik; csillag: immunogolddal jelölt GABAerg axoszomatikus szinapszis. Skála: 1 μm .

Az elektronmikroszkópos felvételeken a sejtmagi TMB reakció termékei, a jellegzetes alakú, elektronárnyékot adó kristályok jelölik az ösztrogén receptor

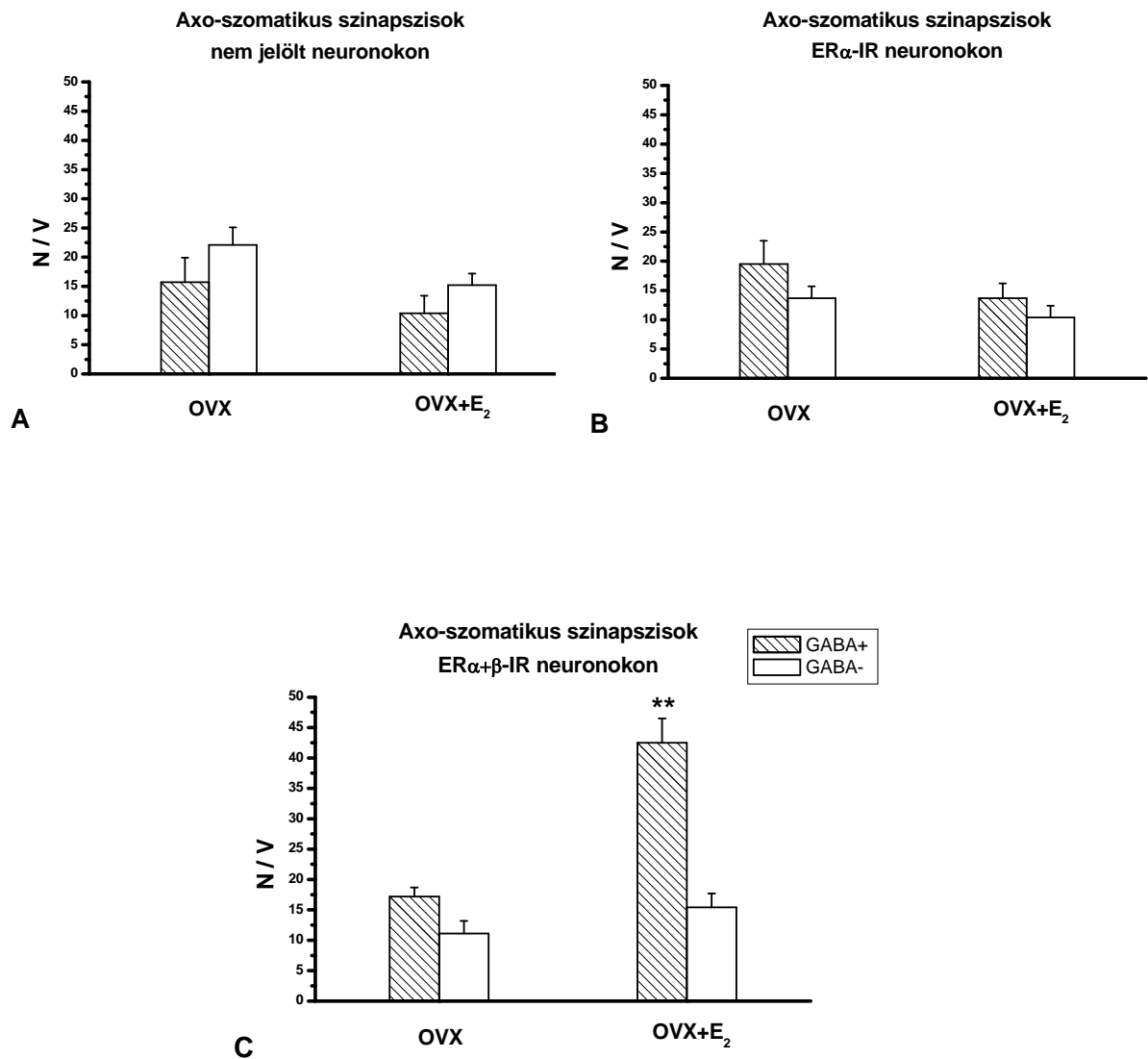
immunreaktív sejteket; a posztembedding immunfestődés is igen specifikus és egyértelműen jelöli a GABAerg végződéseket (2.ábra).

A morfometriai mérések eredményei szerint ovariectomizált állatok AvPv-jében az axo-szomatikus végződések mintázata eltér a mag különböző sejtpopulációiban. Függetlenül attól, hogy α vagy β típusú receptorról van szó, az ER-immunreaktív sejteken végződő GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma magasabb, mint a nem jelölt sejtek esetében. Ezzel a megoszlással ellentétben a nem-jelölt sejtek populációjában az axo-szomatikus szinapszisok zöme nem GABAerg. (3. ábra)



3. ábra. GABAerg és nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma ovariectomizált patkány AvPv-jében. Az ösztrogén receptort expresszáló sejtek több gátló bemenetet kapnak.

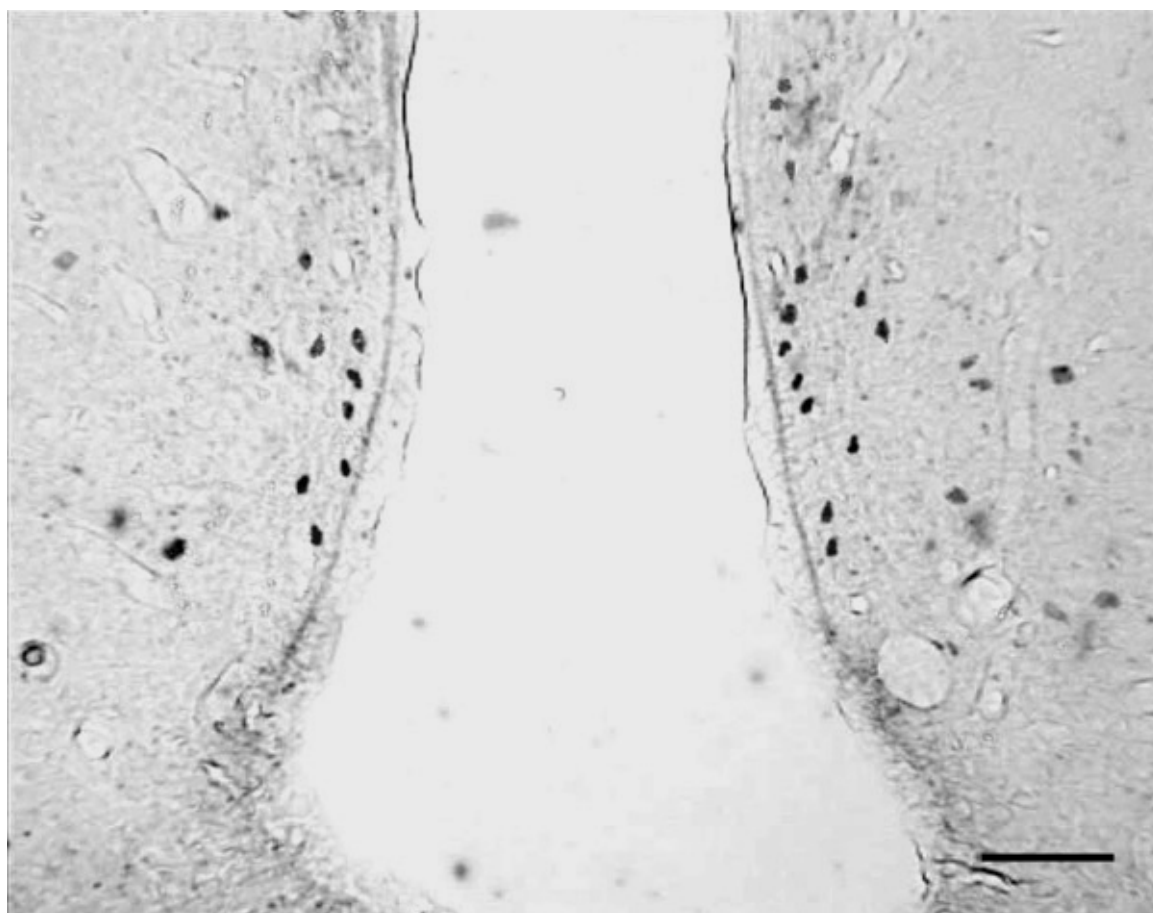
Az AvPv neuronjainak általunk azonosított három csoportja eltérő módon reagál az ösztradiol kezelés hatására. A nem jelölt sejtek és az ER α immunreaktív sejtek esetében a GABAerg és nem GABAerg szinapszisok számában kis mértékű csökkenést észleltünk. Az ER α -fát és β -t együttesen expresszáló sejtekben a nem GABAerg szinapszisok száma végig stabil maradt, ugyanakkor jelentős mértékű emelkedés következett be a GABAerg végzések számában (4. ábra).



4. ábra. 17 β -ösztadiol-indukált változások az AvPv neuronok axo-szomatikus szinapszisainak számában. A: nem jelölt neuronok; B: ER α -immunoreaktív neuronok; C: ER α + β -immunoreaktív neuronok. A morfometriai analízist a Sterio módszer szerint végeztük. ** $p < 0,01$.

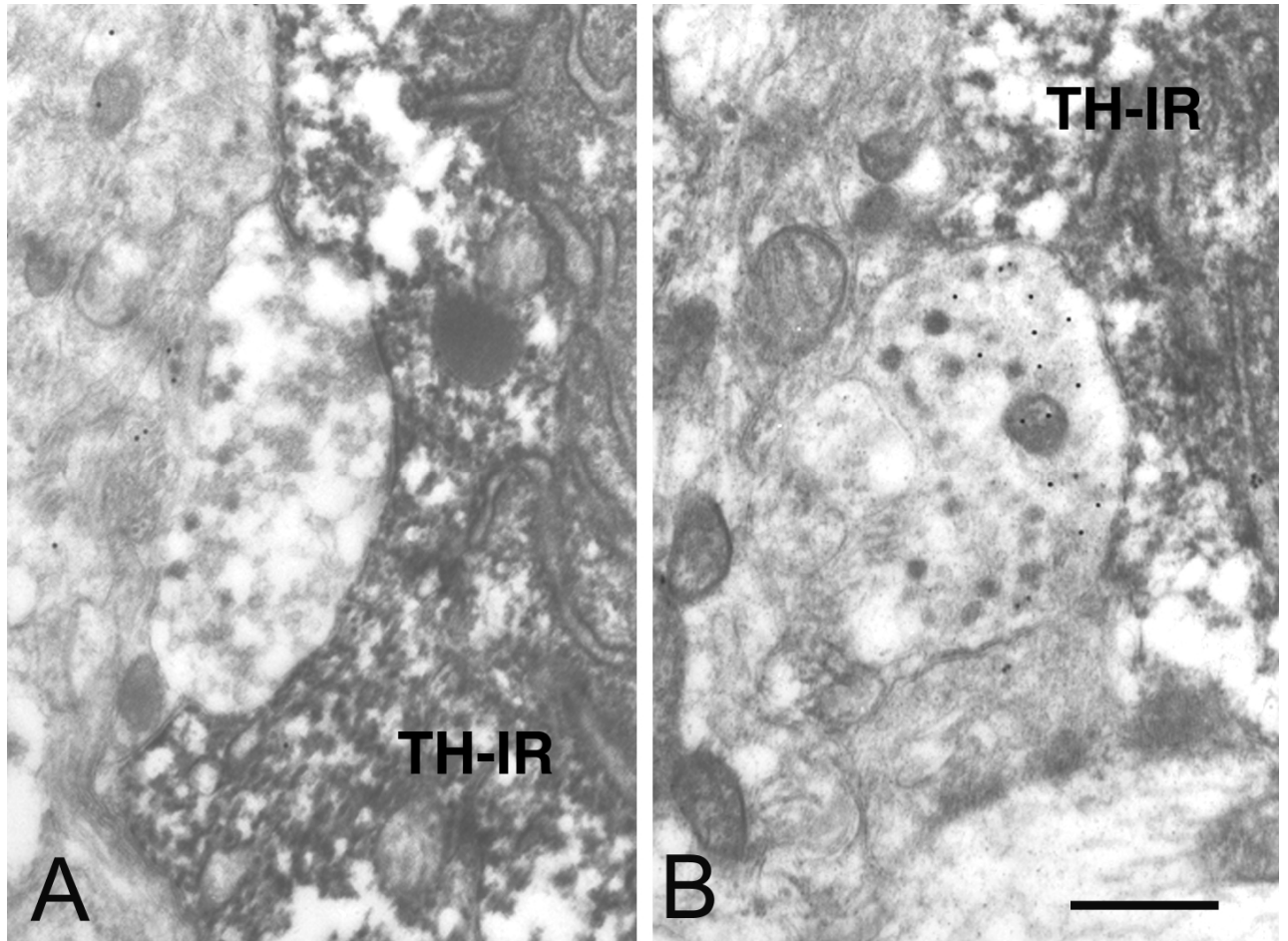
4.2. Ösztradiol indukált szinaptikus átrendeződés a nucleus arcuatus dopaminerg neuronjain

A irodalmi adatokkal megegyezően (Cheung és mtsai. 1997) mi is megfigyeltük a TH-IR neuronok szexuálisan dimorf mintázatát a nucleus arcuatusban; hímekben a mag ventrolaterális régiója jóval több jelölt sejtet tartalmaz. Morfometriai méréseinket a nucleus arcuatus dorsomedialis területén végeztük el (2,3 - 3,6 mm közti régió a bregmától kaudálisan), ahol a dopaminerg sejtek számát illetően a nemek között nincs különbség (5. ábra).



5. ábra. TH-immunopozitív sejtek hím patkány nucleus arcuatusában. Skála: 0,5 mm.

Az elektronmikroszkópos mintákon a DAB reakció elektrondenz terméke a tirozin hidroxiláz immunreaktív sejtek citoplazmájában mutatható ki; a posztembedding immunogold festés igen specifikusnak mutatkozott és egyértelműen jelölte a GABAerg végződéseket (6. ábra).



6. ábra. Tirozin hidroxiláz immunoreaktív neuronon végződő nem GABAerg (A) és GABAerg (B) axo-szomatikus szinapszisok ovariectomizált + 17β -ösztradiollal kezelt patkány nucleus arcuatusában. TH-IR: TH-immunoreaktív neuron; Skála: 0,5 μ m.

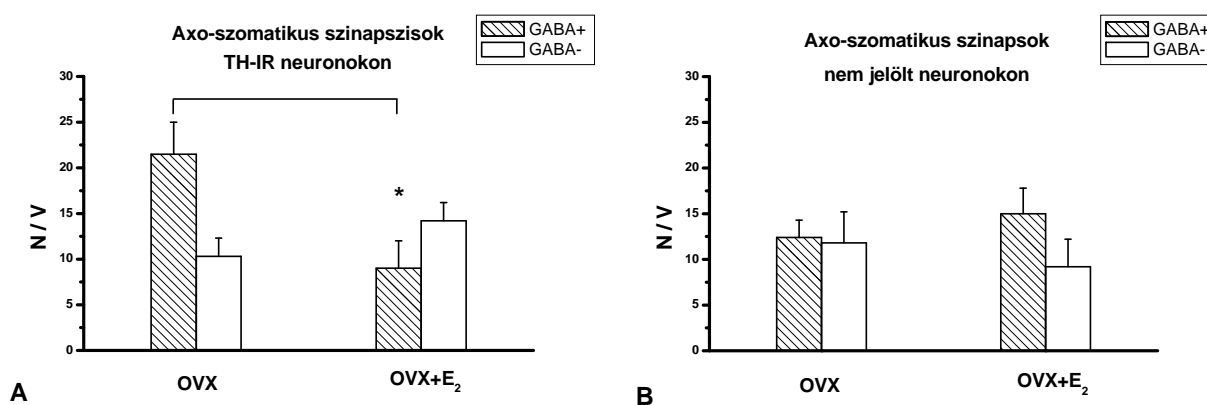
A morfometriai analízis nemi különbséget mutatott ki az axo-szomatikus szinapszisok összmenyiségében; a nőstény állatok arcuatus sejtjei több szinaptikus bemenetet kapnak a hím egyedekhez képest (1. táblázat).

1. táblázat. Az axo-szomatikus szinapszisok száma nőstény és hím patkányok nucleus arcuatusában.

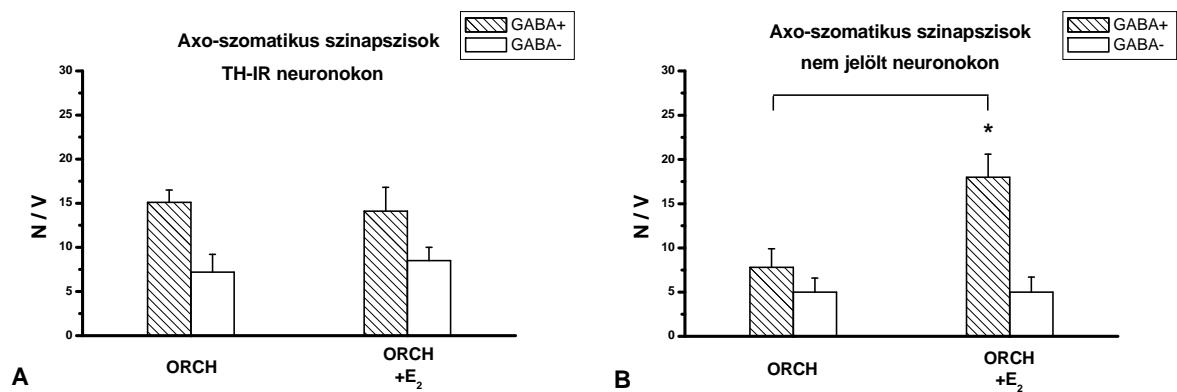
	Nőstény	Hím
TH-IR neuronok	$31,9 \pm 3,3$	$22,4 \pm 2,1^{**}$
Nem jelölt neuronok	$24,2 \pm 2,9$	$12,8 \pm 1,9^{**}$

A szinapszisok száma szignifikánsan kisebb a hím állatokban. $^{**} p < 0,01$

Bár az axo-szomatikus szinapszisok számának összértéke magasabb nőstényekben, a szinaptikus kapcsolatok mintázata, azaz a GABAerg és nem GABAerg szinapszisok aránya hasonlóan mutatkozott gonadektomizált hímekben és nőstényekben egyaránt. A TH-IR idegsejtek szignifikánsan több (körülbelül 2:1 arányban) GABAerg mint nem GABAerg idegvégződést fogadtak ($p < 0,05$), (7A ábra OVX és 8A ábra ORCH), míg a nem dopaminerg neuronokon nagyjából azonos mértékben létesült GABAerg és nem GABAerg szinapszis (7B ábra OVX és 8B ábra ORCH).



7. ábra. 17 β -ösztradiol hatása a TH-immunoreaktív (A) és nem jelölt (B) arcuatus neuronok GABAerg és nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisaira. A TH-IR sejteken végződő GABAerg szinapszisok száma szignifikánsan csökken. $^{*} p < 0,05$.

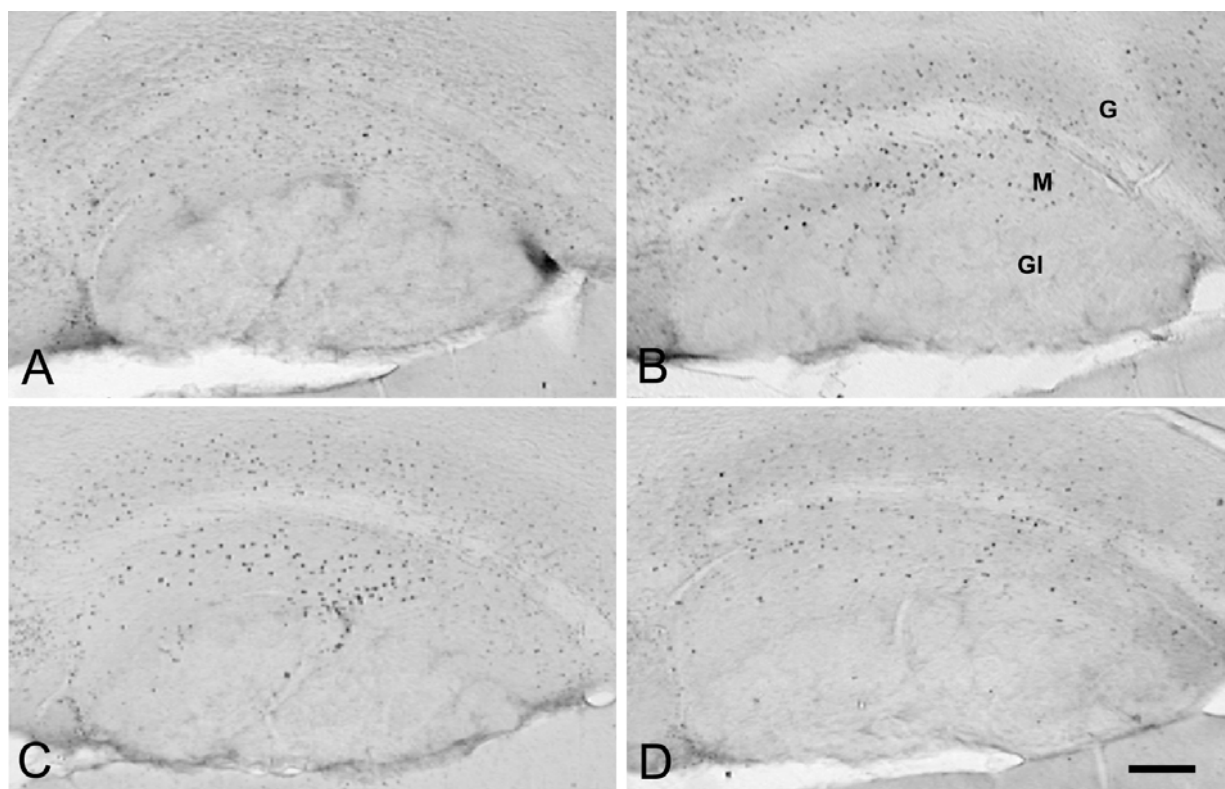


8. ábra. Hím állatokban 17β -ösztadiol kezelést követően növekszik a nem jelölt neuronokon végződő GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma. * $p < 0,05$.

A 17β -ösztadiol hatása specifikusnak mondható, mivel nem minden arcuatus neuron vett részt a szinaptikus átrendeződésben. Ovariectomizált nőstényekben a 17β -ösztadiol egyedül a TH-immunreaktív neuronokon volt képes szignifikánsan csökkenteni a GABAerg szinapszisok sűrűségét (7A és B ábra). Ezzel ellentétben orchidektomizált hímekben a TH-IR sejtek szinaptikus kapcsolataira nem hatott a 17β -ösztadiol, míg a nem dopaminerg neuronokhoz futó GABAerg végződések gyakoriságát megnövelte (8A és B ábra).

4.3. Korfüggő és nemi különbséget mutató változások a járulékos szaglógumó c-Fos expressziójában

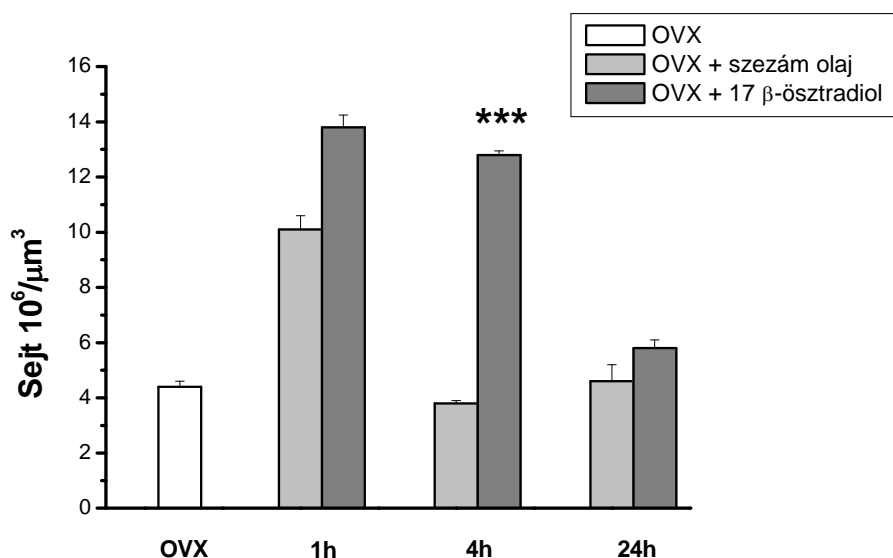
A c-Fos immunreaktivitás a sejtmaghoz volt köthető, és a negatív kontrollok egyikében sem azonosítottunk immunpozitív jelölődést. A járulékos szaglógumó mitrális és granuláris rétegében erős immunreakciót detektáltunk, ugyanakkor a glomeruláris rétegben csak néhány jelölt sejtet észleltünk. Kísérleteink során a c-Fos immunreaktivitást illetően arra a megállapításra jutottunk, hogy a járulékos szaglógumó mitrális és granuláris sejteket tartalmazó rétegei között nincs szemmel látható különbség, és az adatok statisztikai kiértékelése is ezt igazolta. Továbbá, az egyes kísérleti csoportokban (ösztradiol kezelés, az életkor hatása) mindig hasonló szignifikanciájú eltérést tapasztaltunk a két réteget illetően. Így a továbbiakban csak a mitrális sejtek rétegéről szolgáltunk számbéli adatokkal.



9. ábra. c-Fos immunoreaktivitást mutató sejtmagok patkány járulékos szaglógumójában. (A) ovariectomizált állat; (B) 1 óra; (C) 4 óra; (D) 24 óra 17 β -ösztradiol kezelés után. G: szemcsesejt réteg; M: mitrális sejt réteg; Gl: glomeruláris réteg; Skála: 200 μ m.

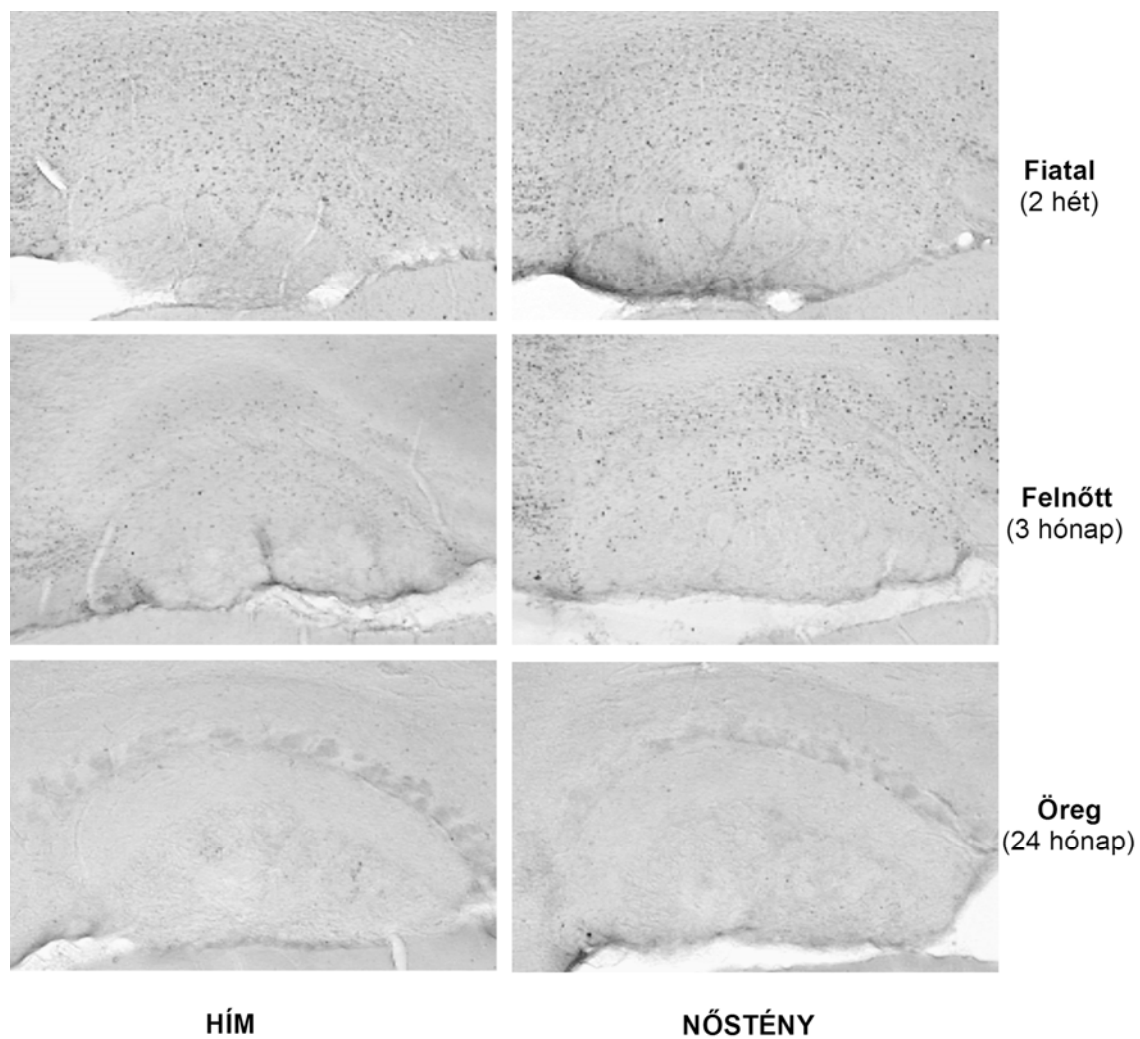
Az ösztrogén kezelés (9. ábra) átmenetileg fokozta a c-Fos expresszió mértékét a mitrális és a granuláris rétegben egyaránt, mivel az ovariectomizált

kontrollokhoz képest (9A ábra) a kezelés után 1 órával (9B ábra) megemelkedett az immunpozitív sejtek száma. Jól ismert, hogy stressz hatására a c-fos gyorsan, de átmenetileg aktiválódhat. Ennek tükrében, az ovariectomizált kontroll csoporthoz viszonyítva, az immunreaktív sejtek számának növekedése egy órával az injektálást követően azt jelzi, hogy a c-Fos expresszió növekedése részben a kísérleti beavatkozás hatása lehet. A 17β -ösztradiol kezelés hatása négy órával a kezelést követően (9C ábra) már egyértelmű, mert statisztikailag szignifikáns különbséget lehetett kimutatni az oldószerrel (szezám olaj) kezelt állatokhoz viszonyítva. Az immunpozitív sejtek száma 24 órával a kezelést követően a kontroll értékre csökkent (10. ábra).

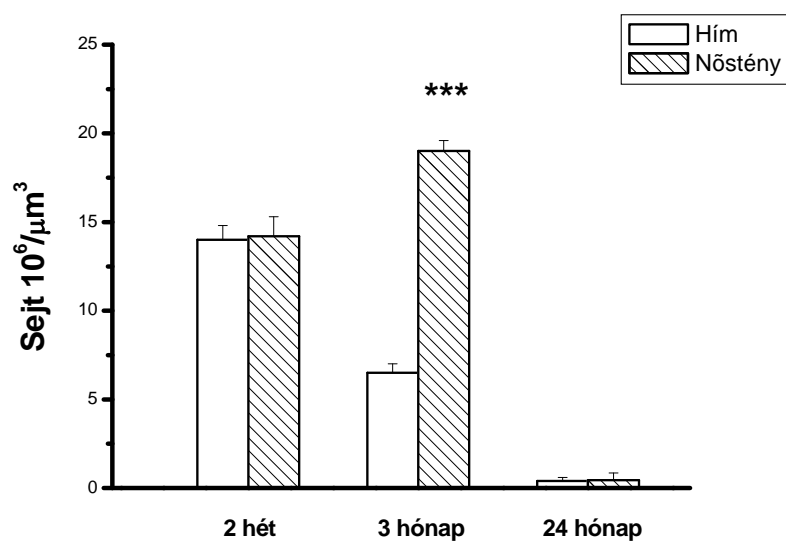


10. ábra. A c-Fos immunoreaktív sejtek számának változása patkány járulékos szaglógumójában a 17β -ösztradiol kezelés után 1, 4 és 24 órával. *** $p < 0,001$ a szezám olajjal kezelt kontrollhoz viszonyítva.

Az életkor-függő változások (11. ábra) tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy fiatal állatokban nemtől függetlenül több c-Fos immunpozitív sejt mutatható ki. Ezzel szemben szignifikánsan erősebb immunjelölődést kaptunk reprodukív korú nőstények esetében hasonló korú hím társaikhoz mérve. Idős állatokban alig vagy egyáltalán nem azonosítottunk immunreaktív sejteket, és a nemeket illetően statisztikai eltérés nem volt kimutatható (12. ábra).



11. ábra. A c-Fos immunreaktív sejtek számának korfüggő és nemi különbséget mutató változása patkány járulékos szaglógumójában. Skála: 200 μ m.



12. ábra. A c-Fos immunoreaktív mitrális sejtek számának változása különböző korú hím és nőstény patkányok járulékos szaglógumójában. Felnőtt állatokban a nőstények szignifikánsan több jelölt sejtet tartalmaznak, idős állatokban gyakorlatilag nincs jelölődés. *** $p < 0,001$

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

5.1. Szinaptikus átrendeződés az anteroventrális periventriculáris nucleus-ban: az ER α és ER β szerepe

Kísérletes adataink azt mutatják, hogy a 17 β -ösztradiol indukált axo-szomatikus szinapszisok átrendeződése az AvPv-ben sajátos módon történik, mivel a hormon különböző módon hat a mag egyes sejtpopulációira. Kettős immunfestést alkalmazva sikerült bebizonyítanunk, hogy ezekben a folyamatokban az ER β jelenléte a meghatározó. 17 β -ösztradiollal kezelt ovariectomizált nőstény patkányokban a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok számának szignifikáns növekedését tapasztaltuk, azonban csak a béta ösztrogén receptort expresszáló neuronokban.

Ezek az adatok megerősítik Langub és munkatársainak észrevételeit, melyek az ösztrogén receptor immunreaktív sejtek axo-szomatikus szinapszisainak denzitásbeli növekedését írták le. A preembedding ösztrogén receptor (ER α és ER β), valamint a posztembedding GABA immunfestődés kombinálásával ezeket a megfigyeléseket specifikusabbá tettük, mivel pre- és posztzinaptikus szinten egyaránt igazolni tudtuk az ösztrogén hatás specifikitását. Adataink szerint a hormon csak a GABAerg szinapszisokra hat, de ezzel együtt a posztzinaptikus sejtek tekintetében is különbséget találtunk. Az alfa és béta ösztrogén receptorok expressziója alapján a neuronok három populációját tudtuk elkülöníteni egymástól, melyek eltérő módon reagálnak a hormonális környezet változására. Az ösztrogén receptort nem tartalmazó, vagy csak az alfa ösztrogén receptort expresszáló neuronok szinaptikus kapcsolataira nem volt hatással a 17 β -ösztradiol kezelés, míg az ER-alfát és ER-bétát tartalmazó sejtek csoportjában a szinapszisok száma megemelkedett a kezelést követően.

Az a tény, hogy a 17 β -ösztradiol csak az AvPv GABAerg axo-szomatikus végződéseiben indukált szinaptikus átrendeződést, alátámasztja a GABAerg rendszer fontosságát a gonadotropin felszabadulás hormonális szabályozásában (Leranth és mtsai. 1985; Witkin és mtsai. 1991; Horvath és mtsai. 1993; Jung és mtsai. 1998; Sim és mtsai. 2000; Mitsushima és mtsai. 2003). Korábbi kísérleteink során változást észleltünk a nucleus arcuatus GABAerg axo-szomatikus szinapszisaiban mind ovariectomizált + 17 β -ösztradiol kezelt, mind ciklizáló állatokban (Parducz és mtsai. 1993a; Csakvari és mtsai. 2007). Itt érdemes megjegyezni, hogy a szinapszisok számának változása ellentétes irányú a két agyterületben; a nucleus arcuatus-ban a

hormon a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok csökkenését okozta, míg az anteroventrális periventriculáris magban ezzel ellentétes irányú változás, vagyis a szinapszisok számának emelkedése volt megfigyelhető. Elmondható, hogy a nemi hormonok fokozzák bizonyos agyterületek szinaptikus plaszticitását, de hatásuk nem egyféle módon valósul meg.

Nemrégiben Polston és munkatársai (2004) konfokális mikroszkópos kísérleteik során arra a megfigyelésre jutottak, hogy a hormonkezelés hatására nem változott GAD65-IR boutonok száma az AvPv neuronjain. Ezt a megfigyelést kísérleteinkkel nem tudtuk igazolni, de az eltérés oka feltehetően az lehet, hogy az alkalmazott technikák különbözőek, azaz, a fény- és elektronmikroszkópnak eltérő a felbontóképessége. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy a szinaptikus átrendeződés egyik fázisában sem észleltünk axon degenerációt, sem az AvPv, sem a nucleus arcuatus vonatkozásában. Ez azt jelzi, hogy a szinaptikus kapcsolatok számában bekövetkező változás oka inkább az, hogy a szinaptikus végződéses bizonyos ideig eltávolodnak a szómától, mintsem esetleges degeneratív változások állnának az események hátterében.

A mag komplex afferens és efferens kapcsolatait figyelembe véve megállapítható (Gu és Simerly 1997; Hutton és mtsai. 1998; Polston és Simerly 2006), hogy az AvPv olyan neuronokat tartalmaz, amelyek közvetlenül hathatnak a GnRH és a TIDA sejtek aktivitására, vagyis, kiemelkedő szerepe van a nemi hormonok LH és prolaktin szekréciójára kifejtett visszacsatoló hatásának közvetítésében. Az ilyen típusú mechanizmusok hátterében igen érzékeny szabályozás állhat, melynek morfológiai alapja lehet egy hormon indukált specifikus szinaptikus átrendeződés. Mindkét típusú ösztrogén receptor expresszálódik az AvPv-ben (Langub, Jr. és mtsai. 1994; Orikasa és mtsai. 2002; Orikasa és Sakuma 2003), és az ösztrogén az ER β -IR neuronokon jelentkező hatásának értelmezésekor figyelembe kell vennünk azt, hogy ezen sejtek 83%-a az α típusú ösztrogén receptort is expresszálja, ami a hormon hatására egy jóval komplexebb választ eredményezhet. Egy sejten belül a receptor molekulák mindkét formájának jelenléte heterodimerek képződését eredményezi, ami megváltoztathatja a transzkripciót, és ennek következtében a sejtek eltérő módon reagálhatnak az ösztrogén hatására attól függően, hogy miképp alakul a sejtekben az ER α és ER β aránya.

Érdekes megjegyezni, hogy nőstény patkányok AvPv-jében a TH immunreaktív sejtek előfordulása átfed az ER β -immunpozitív sejtekkel (Orikasa és

mtsai. 2002), vagyis a dopaminerg neuronok részt vesznek a hormonálisan indukált szinaptikus átrendeződésben. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a nucleus arcuatus-ban a TH-immunreaktív sejtek szinaptikus kapcsolatait szintén érinti a hormonhatás. Ez a hasonlóság segíthet magyarázatot adni megfigyeléseink fiziológiai jelentőségére, feltételezve, hogy a dopaminerg neuronok ösztradiol-indukálta szinaptikus változása hatással lehet a luteinizáló hormon és a prolaktin szekréciójára.

5.2. 17 β -ösztradiol-indukált változások a nucleus arcuatus tirozin hidroxilázt tartalmazó neuronjainak axo-szomatikus szinapszisaiban

A nucleus arcuatus TH-immunoreaktív dopaminerg neuronjainak többsége a neuroendokrin szabályozásban kiemelt szerepet játszó tubero-infunduláris dopaminerg rendszerhez tartozik. A sejtek axonjaiból felszabaduló dopamin az eminencia mediana portális rendszerén keresztül transzportálódik az adenohipofízisbe, ahol a laktotróp sejtekben lévő receptorokhoz kötődve a prolaktin (PRL) szekréció gátlásában vesz részt. Korábban ismert volt, hogy ezek a neuronok erős GABAerg beidegzést kapnak és az értekezésben ismertetett kísérleteink ezen, immunhisztokémiaiailag jól definiálható szubpopuláció szinaptikus kapcsolatainak 17 β -ösztradiol indukált változásának nyomon követésére irányultak.

A preembedding TH immunhisztokémia és a posztembedding immunogold módszer kombinálásával sikerült a nucleus arcuatus-ban két, egymástól eltérő idegsejt populáció azonosítani, és a GABAerg valamint nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok mennyiségét a meghatározni ovariectomizált, valamint ovariectomizált és ösztrogén kezelt nőstény patkányokban, továbbá orchidektomizált és orchidektomizált + ösztrogén kezelt hímekben.

A 17 β -ösztradiollal kezelt állatokból származó adatok világosan mutatják, hogy az ösztradiol a nőstényekhez hasonlóan a hímekben is képes volt szinaptikus átrendeződést indukálni, és mindkét nem esetében a GABAerg szinapszisokat érintette a változás. Ugyanakkor, a hormon által előidézett szinaptikus plaszticitás szexuálisan dimorfnak mondható, mégpedig abban az értelemben, hogy a nőstények esetében a TH immunreaktív neuronok, míg hímeknél a nem jelölt sejtek vettek részt a plasztikus folyamatokban. Ovariectomizált nőstényekben a 17 β -ösztradiol a TIDA neuronok szinaptikus átrendeződését indukálta: a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma szignifikánsan csökkent 24 órával a kezelést követően. A nem

jelölt arcuatus neuronokra a hormonkezelés hatástalannak bizonyult, mivel azok szinaptikus kapcsolatai változatlanok maradtak. Ez a megfigyelés jó egyezést mutat korábbi eredményünkkel, amikor a retrográd jelölő molekula, a Fluorogold alkalmazásával jelöltük a nucleus arcuatus eminencia mediana-hoz projektáló sejteit (Parducz és mtsai. 2003). Ezen kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az ún. "hypophyseotrop" idegsejtek szinaptikus kapcsolatai eltérnek a nem jelölt sejtek esetében tapasztalttól, és a sejtek ezen populációja reagál a 17β -ösztradiol kezelésre. Jelenlegi adataink alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy a Fluorogolddal jelölt sejtek valóban a TIDA neuronoknak felelnek meg.

Morfológiai megfigyeléseink a TIDA sejtek prolaktin szekréció szabályozásában játszott szerepével kapcsolatban funkcionális szempontból is értelmezhetőek. Általánosan elfogadott tény, hogy a PRL szekréciója egyrészt lépést tart a cirkadián ritmussal, másrészt a serkentő és gátló bemenetek igen komplex és érzékeny egyensúlya révén szabályozott (Freeman és mtsai. 2000). Kísérleti adatok igazolják, hogy az exogén ösztrogén képes stimulálni ovariectomizált állatok PRL szekrécióját (Chen és Meites 1970; Caligaris és mtsai. 1974). A hatás összetett, a hormon a PRL homeosztázis számos anatómiai pontjára hatással lehet, beleértve a hypothalamus-t és a hipofízist is (Freeman és mtsai. 2000).

Az ösztrogén dopaminerg idegsejteken jelentkező hatásának specifikása, amit kísérleteink eredményei jól mutatnak, alátámasztja azt az elképzelést, mely szerint a hormonálisan indukált szinaptikus átrendeződésnek funkcionális következményei lehetnek. Nőstény állatok TH neuronjain végződő gátló GABAerg bemenetek számának csökkenése 24 órával az ösztrogén kezelést követően azt eredményezheti, hogy ezzel párhuzamosan a sejtek aktivitása megnő, azaz fokozódik a DA felszabadulása. Ezt a feltételezést sok irodalmi adat támasztja alá, amelyek egyértelműen mutatják, hogy a TIDA neuronok alap aktivitása ovariectomizálás hatására csökken, amit az ösztrogén képes visszaállítani az eredeti szintre (DeMaria és mtsai. 1998; Freeman és mtsai. 2000). Az ösztrogén előidézte szinaptikus változások összhangban vannak a PRL felszabadulás végső fázisával, amit a fiziológiás megfigyelések is igazolnak (DeMaria és mtsai. 2000). Értelmezéseink szerint az ösztrogén komplex módon hat az egyes folyamatokra: kezdeti hatásként fokozza a prolaktin szekrécióját (Chen és Meites 1970; Caligaris és mtsai. 1974) és morfológiai szinaptikus átrendeződést indukál a nucleus arcuatus-ban, ami némi fázis eltolódással növeli a TIDA neuronok aktivitását, és ezáltal gátolja a PRL szekrécióját.

Az a megfigyelés, hogy a GABAerg szinapszisok ösztradiol indukált átrendeződése nemcsak nőstényekben, hanem hímekben is megfigyelhető, arra utal, hogy a hormonnak központi szerepe lehet a nucleus arcuatus strukturális szinaptikus plaszticitásában. A hormonhatás specifikusnak mondható, mivel nőstényekben a TIDA neuronokat, hímeknél pedig a nem jelölt sejtpopulációt érinti a változás. Orchidektomizált hímekben szignifikánsan megnőtt a nem jelölt sejtek GABAerg axo-szomatikus szinapszisainak száma. Jól ismert tény, hogy hím állatok nucleus arcuatus-ának dopaminerg rendszere az ösztrogén célpontjában áll: orchidektomizált állatokban a hormon fokozza a TIDA neuronok alapaktivitását (Shieh és Pan 1996). Ahhoz azonban, hogy a valódi hatásmechanizmussal tisztában legyünk, további tanulmányok szükségesek.

Jelenlegi eredményeink kiegészítő adatokat nyújtanak az ösztradiol nucleus arcuatus DA rendszerére kifejtett hatásának megértéséhez. Az eredmények egyértelműen felfedik, hogy a hormon indukált szinaptikus átrendeződés, amit már korábban is leírtunk, specifikus abban az értelemben, hogy hatása főként a TH immunreaktív sejteket, vagyis a tuberoinfundibuláris dopaminerg rendszert érinti.

5.3. Az életkor és az ösztrogén hatása a járulékos szaglógumó c-Fos expressziójára

1990 óta egyre inkább bizonyított tény, hogy a neurogenesis felnőtt korban is folytatódik, legkifejezettebb módon a szubventrikuláris zónában (Luskin 1993), de alacsonyabb mértékben a szaglógumóban is megfigyelhető (Peretto és mtsai. 2001). Nemcsak a fő (MOB), hanem a járulékos szaglógumó (AOB) is nagyon plasztikus terület (Peretto és mtsai. 2001; Wilson és mtsai. 2004). Klintsova és munkatársai (1995) kimutatták, hogy a szaglógumó elektromos stimulálása markánsan megnövelte a c-Fos immunreaktív sejtek számát az AOB mitrális, granuláris és glomeruláris sejteinek rétegében.

Eredményeink szerint a járulékos szaglógumóban a c-Fos fiziológiás expressziója szexuálisan dimorf, és az expresszió mértéke a kor előrehaladtával csökken. Az ösztrogén kezelés növelte az AOB c-Fos-t expresszáló sejteinek a számát.

A c-Fos expressziót rendszeresen használják az idegsejtek aktivitásának nyomon követésére (Curran és Morgan 1995). Az már régóta ismert, hogy a c-Fos

nagyon sokféle fiziológiás funkcióban vesz részt, úgymint intracelluláris szignál, sejt differenciáció, apoptózis, neuronális plaszticitás, tanulás és memória képzés (Dragunow és Preston 1995; Zhang és mtsai. 2000). Munkánk során az öreg állatok esetében jelentős csökkenést találtunk a sejtek c-Fos expressziójában. Ez vagy annak köszönhető, hogy a sejtek elveszítik a fehérjét expresszáló képességüket, vagy pedig a sejtek funkcionális károsodásának következménye.

Ez a megfigyelés egybevág azokkal az előzetes tanulmányokkal, amelyek életkor-függő csökkenést mutattak ki a gerincvelő szürkeállományában azon sejtek számában, amelyek fiziológiás körülmények között c-Fos fehérje szintetizálására képesek (Kim és mtsai. 1999). Mivel a c-Fos-ról ismert, hogy részt vesz a központi gének működésének koordinálásában, a fiatal patkányokban talált nagyobb számú immunreaktív sejt egy intenzívebb növekedési szintet és differenciációt tükrözhet. Azt tapasztaltuk, hogy felnőtt hímekben a c-Fos-jelölt sejtek száma alacsonyabb, amit azonos korú nőstényekben. Igen fontos megjegyezni, hogy ez éles ellentétben áll azzal, amit fiatal egyedek esetén figyelhattunk meg, ugyanis náluk a jelölt sejtek mennyiségében nem jelentkezett nemhez kapcsolt különbség. A kapott eredményeket magyarázhatja az, hogy az állatok egyes életszakaszaiban más és más a hormonális környezet.

Számos publikáció született arról, hogy a nemi hormonok specifikus strukturális változásokat idéznek elő (Segovia és mtsai. 1984; Segovia és mtsai. 1986; Valencia és mtsai. 1986), valamint aktivizáló hatást fejtenek ki a járulékos szaglógumóban (Bakker és mtsai. 1996; Paredes és mtsai. 1998; Halem és mtsai. 1999), nem csak az egyedfejlődés során, hanem felnőtt korban is. Hím patkányokban a közvetlen születés utáni agyi ösztrogén szintézis alapvető jelentőségű a felnőttkori szexuális viselkedésformák kialakításában. Ez morfológiailag a vomeronazális rendszer c-Fos expressziójának vizsgálatával követhető nyomon. Érdekes, hogy a neonatális agyi ösztrogén szint csak a vomeronazális útvonal központi területein befolyásolja a felnőttkori c-Fos expressziót, a perifériás részekben (járulékos szaglógumó, az amygdala medialis része) nem. Ez arra utalhat, hogy ez az ösztrogénnek tulajdonítható differenciálódás valamivel később játszódhat le az egyedfejlődés során, talán a felnőtt korban. Így, felnőtt nőstényekben a tanulmányaink során észlelt fokozódó c-Fos expresszió annak köszönhető, hogy magasabb volt az állatok vérében keringő ösztrogén szintje.

Az ösztrogén c-Fos expressziójában játszott szerepét támasztja alá az, hogy nőstény állatok gonadektomiája drasztikus hatással volt a c-Fos expresszáló sejtek mennyiségére a járulékos szaglógumó mitrális és granuláris rétegében, míg az ösztrogénnel való kezelés közel akkorára növelte meg ezt az értéket, mint amit intakt patkányokban mértünk. Egy hasonló tanulmányban a tesztoszteron-propionát serkentette a szagok által kiváltott c-Fos expressziót gonadektomizált nőstények és hímek AOB-jában egyaránt (Paredes és mtsai. 1998), mutatva, hogy a tesztoszteronnak közvetett hatása lehet az idegsejtek c-Fos expressziójára. Ez oly módon valósulhat meg, hogy a tesztoszteron az aromataz segítségével ösztradiollá alakul, és így fejt ki hatását (Naftolin 1994; Bakker és mtsai. 1996).

Az AOB-ban a c-Fos immunopozitív sejtek számának növekedése, ami a 17β -ösztradiol kezelést követően egy órával jelentkezett, feltehetően a kezelés hatásának tulajdonítható, mivel csak az oldószerrel történő injektlást követően is hasonló eredményt kaptunk. A stressz hatására a közvetlen korai gének, beleértve a c-Fos-t, gyorsan, de átmenetileg aktiválódnak az egyes agyterületeken, így a szagló régióban is (Abraham és Kovacs 2000). Ugyanakkor, 4 és 24 órával az injektlást követően a csak oldószerrel kezelt állatokban nem volt szignifikáns eltérés a c-Fos immunreaktív sejtek számában ovariectomizált kontroll állatokhoz viszonyítva. Ez azt jelenti, hogy a kezelés utáni 4 órával kapott eredmények (c-Fos immunreaktív sejtek számának növekedése) a 17β -ösztradiol hatásának tulajdoníthatóak.

Az AOB szexuálisan dimorf struktúra, és lényeges szerepet tölt be a szaporodással kapcsolatos viselkedésben. Eredményeink alapján elmondható, hogy az AOB-ban létezik egy ösztrogénre érzékeny sejtpopuláció, amelyben a c-Fos fontos szerepet játszik a sejtszintű események szabályozásában. Továbbá, igen valószínű, hogy az AOB neuronális aktivációjának szabályozása az ER β -án, nem pedig az alfa típusú ösztrogén receptoron keresztül valósul meg, mivel eddig csak az ER β jelenlétét sikerült kimutatni az AOB-ban (Shughrue és mtsai. 1997).

Kísérleteink eredményei elsőként adnak információt arról, hogy a járulékos szaglógumóban a c-Fos expresszió mértéke csökken az életkor előrehaladtával. A c-Fos expresszió visszaesése maga után vonja a sejtek génaktivitást koordináló képességének hanyatlását, ami a plasztikus képességek gyengüléséhez vezet. Továbbá, az ösztrogén kezelés pozitívan hatott az AOB c-Fos expressziójára, ami összefüggésben lehet az AOB korábban említett szexuális dimorfizmusával.

Immunhisztokémiai vizsgálataink további morfológiai adatokkal szolgálnak a fizioiógiás körülmények között mérhető és a 17 β -ösztadiol indukált c-Fos expresszió regionális és időbeli eloszlására vonatkozóan patkányok járulékos szaglógumójában. Eredményeink szerint mind az életkor, mind a hormonális környezet jelentősen befolyásolja a sejtek génaktivitást szabályozó képességét. Megfigyeléseink révén bepillantást nyerhetünk az agy plasztikus képességeinek életkorfüggő csökkenésébe, és kiterjeszthetjük értelmezéseinket a hormonálisan szabályozott plaszticitásról.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi időszak kutatásainak fényében alapvetően megváltozott szemléletünk a nemi hormonok és elsősorban az ösztrogén szerepét illetően. Kiderült ugyanis, hogy a neuroendokrin szabályozásban játszott szerepe mellett fontos organizáló és morfogenetikai hatással rendelkezik, ennek alapján inkább számos fehérje expresszióját befolyásoló általános modulátornak tekintik. Felelős az idegrendszer szerveződésében és működésében megnyilvánuló nemi különbségek kialakulásáért, ugyanakkor a kísérletes adatok azt mutatják, hogy fontos szerepet játszhat a kifejlett idegrendszer plasztikus folyamataiban is. A felnőttkori szinaptikus plaszticitás egyik példaként irodalmi adatokkal összhangban korábban kimutattuk, hogy 17β -ösztradiol hatására a szinaptikus kapcsolatok jellegzetes átrendeződése történik a központi idegrendszer egyes területein.

Immunogold technikával végzett kvantitatív posztembedding immuncitokémiai vizsgálatokkal munkacsoportunk igazolta, hogy felnőtt nőstény patkányok nucleus arcuatusá-ban az axo-szomatikus végződések többsége GABA immunoreaktív. Ovariectomizált állatok 17β -ösztradiollal történő egyszeri kezelése a GABA-IR axo-szomatikus szinapszisok számának szignifikáns csökkenését eredményezte, de nem volt hatással az immunnegatív axo-szomatikus szinapszisokra. Ezek az adatok egyértelműen mutatják, hogy az ösztradiol fiziológiás koncentrációja megváltoztatja a nucleus arcuatushoz futó gátló hatású GABAerg axo-szomatikus bemenetek mennyiségét. Az utóbbi időkben azt is kimutattuk hogy az ösztradiol kezelés nem okoz változást az arcuatus axo-dendritikus szinapszisainak számában, a serkentő tüskeszinapszisok térfogati sűrűsége viszont szignifikánsan megnő ilyen körülmények között.

Ezek az eredmények jelezték, hogy a 17β -ösztradiolnak a szinaptikus kapcsolatok átrendeződésére gyakorolt hatása specifikus jellegű, nem egyforma módon érinti a különböző típusú szinapszisokat. A morfológiai szinaptikus plaszticitás ezen különleges formájának sejt- és molekuláris szintű hátterét vizsgálva lényeges kérdés annak tisztázása, hogy a posztszinaptikus neuronok, azaz a célsejtek milyen szerepet játszanak a folyamatban. Erre vonatkozó első vizsgálataink egyértelműen arra utaltak, hogy a hormon hatása a posztszinaptikus sejtektől is függ. A nucleus arcuatus-ban van egy nagyon jól definiálható sejtpopuláció, az ún. "hypophyseotrop" neuronok, melyek projekcióikat az eminencia mediana-ba küldik,

ezek - adataink szerint - kevesebb axo-szomatikus bemenetet kapnak, mint a nem jelölt neuronok. A magon belül a 17β -ösztadiol indukált szinaptikus átrendeződés a neuronok ezen (az eminencia mediana-ba vetülő) alpopulációját érinti, ahogy azt az axo-szomatikus szinapszisok számának csökkenése bizonyítja.

Ezen előzmények alapján az értekezésben összefoglalt kísérleteink célja az volt, hogy további adatokat szerezzünk a hormon specifikus hatásáról, annak szexuálisan dimorf jellegéről és sejtszintű hátteréről, az ösztrogén hatás intracelluláris szignalizációjáról.

A kísérletek során kettős immunfestést végeztünk: preembedding módszerrel azonosítottuk a tirozin hidroxilázt, valamint az alfa és béta ösztrogén receptort expresszáló neuronokat, majd a beágyazott anyagból készített ultravékony metszeteken immunogold eljárással jelöltük meg a GABAerg idegvégződéseket. Az azonosított neuropopulációkhoz tartozó idegsejtek beidegzési mintázatának ill. a mintázat hormonkezelésre történő változásainak morфомetriai elemzését a Sterio f. disector módszerrel végeztük.

Fontosabb eredményeink:

Kettős immunfestés utáni morфомetriai mérésekkel igazoltuk, hogy az anteroventrális periventriculáris nucleus-ban az ösztrogén receptort expresszáló neuronok szinaptikus mintázata (serkentő és gátló axo-szomatikus szinapszisainak aránya) eltér a mag többi neuronjától. Az ER-immunoreaktív sejteken végződő GABAerg axo-szomatikus, gátló szinapszisok száma magasabb, mint a nem jelölt sejtek esetében. A hormonszint változását az AvPv-ben is szinapszis átrendeződés kíséri, de a nucleus arcuatus-szal ellentétben ebben a magban a 17β -ösztadiol a GABAerg szinapszisok számának növekedését indukálja. Adataink szerint a hormon csak a GABAerg szinapszisokra hat, de ezzel együtt a posztszinaptikus sejtek tekintetében is különbséget találtunk. Az alfa és béta ösztrogén receptorok expressziója alapján a neuronok három populációját tudtuk elkülöníteni egymástól, melyek eltérő módon reagálnak a hormonális környezet változására. Az ösztrogén receptort nem tartalmazó, vagy csak az alfa ösztrogén receptort expresszáló neuronok szinaptikus kapcsolataira nem volt hatással a 17β -ösztadiol kezelés, míg az ER-bétát is tartalmazó sejtek csoportjában a szinapszisok száma megemelkedett a kezelést követően.

A nucleus arcuatus-ban a tubero-infundibuláris rendszerhez tartozó dopaminerg neuronok szinapszisait tanulmányozva arra a következtetésre jutottunk, hogy az axo-szomatikus végződések száma és azok hormon indukálta változásai nemileg különböznek. A hím állatok neuronjai szignifikánsan kevesebb szinaptikus bemenetet kapnak, ugyanakkor a TH immunoreaktív populáció esetében az ingerő/gátló végződések aránya mindkét nemben azonos, gátló túlsúlyt mutat. Igazoltuk, hogy ovariectomizált nőstényekben és orchidektomizált hímekben a hormon különböző módon hat és a hatás specifikus jellegét a posztzinaptikus sejt is befolyásolja. Nőstény patkányokban a 17β -ösztadiol a TH-IR neuronokon végződő GABAerg axo-szomatikus szinapszisok számát csökkenti. Hímekben ilyen körülmények között a TH-IR neuronok szinapszisai nem változnak, ugyanakkor megnő a nem jelölődő sejtek gátló bemeneteinek száma.

A központi idegrendszer egyik legplasztikusabb területét, a járulékos szaglógumót vizsgálva megállapítottuk, hogy a c-Fos expresszió szexuálisan dimorf és erős korfüggést mutat. Fiatal patkányokban nincs nemi különbség a c-Fos aktivitásban, felnőtt nőstényekben szignifikánsan magasabb a jelölt sejtek száma, míg idős állatokban, a nemtől függetlenül, gyakorlatilag nincs c-Fos expresszió. 17β -ösztadiol kezelés átmenetileg megnöveli a jelölt sejtek számát. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a járulékos szaglógumóban létezik egy ösztrogénre érzékeny sejtpopuláció, amelyben a c-Fos fontos szerepet játszik a sejtszintű események szabályozásában. Ennek a kérdésnek további vizsgálata azért lényeges, mert a molekuláris mechanizmusok felderítését segítheti, hiszen a hormon a közvetlen korai gének aktiválásán keresztül képes a transzkripciós folyamatokat és az intracelluláris szignalizációs útvonalakat befolyásolni.

A dolgozatban összefoglalt újabb kísérleti adatokat értékelve a felnőttkori szinaptikus plaszticitás alapjait képező sejt és molekuláris szintű mechanizmusok megértése szempontjából lényeges az a felismerés, hogy az ösztrogén hatására létrejövő változásokat a preszinaptikus és posztzinaptikus neuronok egyaránt befolyásolják. Fontos hangsúlyozni, hogy a szinaptikus átrendeződés egyik fázisában sem észleltünk axon degenerációt, ami azt jelzi, hogy a szinapszisok számában bekövetkező változás oka az, hogy az idegvégződések bizonyos ideig eltávolodnak a szómától, azaz nem degeneratív folyamatok állnak az események hátterében.

Figyelemreméltó tény, hogy az idegi elemek mellett az asztrociták is reagálnak a hormonális hatásokra és a kísérleti adatok szerint a szinaptizáló membránok

molekuláris szerkezete is reverzibilis változásokon megy keresztül, amely szorosan követi a plazma ösztadiol szintjének ciklikus fluktuálását. Mivel a membrán-membrán interakciók fontos szerepet játszhatnak a szinapszis átrendeződésben, a hormonhatáshoz kapcsolható membránszintű folyamatok vizsgálata további lényeges adatokkal szolgálhat az idegrendszeri plaszticitás megértéséhez.

7. SUMMARY

During recent decades, it has become a generally accepted that the function of gonadal steroids in the brain extends beyond simply regulating reproductive and/or neuroendocrine events. In addition, or even more importantly, gonadal steroids participate in the shaping of the developing brain, while their actions during adult life are implicated in higher brain functions such as cognition, mood and memory. A large body of evidence indicates that gonadal steroid-induced functional changes are accompanied by alterations in neuron and synapse numbers, as well as in dendritic and synaptic morphology. These structural modifications are believed to serve as a morphological basis for changes in behavior and cellular activity. Due to their growing functional and clinical significance, the specificity, timeframe, as well as the molecular and cellular mechanisms of hormone-induced neuroplasticity have become the focus of many studies.

The first experiments have clearly indicated that the neuronal plasticity in certain hypothalamic nuclei is significantly enhanced by estrogen. In the arcuate nucleus the synapses exhibited a phasic remodeling, which could be linked to the fluctuation in hormone levels during the estrous cycle. The number of axo-somatic synapses on arcuate neurons decreased between the morning and afternoon of proestrus and remained low during estrus morning, and then rose again to the metestrus/diestrus level.

Further studies have revealed that the effect of hormone is specific, because not all types of synapses are affected. Quantitative postembedding immunocytochemical analysis at the electron microscopic level has indicated that the majority of axosomatic synaptic terminals on arcuate neurons of ovariectomized rats are GABA-immunoreactive. The administration of a single dose of 17β -estradiol resulted in a significant decrease in the number of these GABA-IR synapses. In contrast, estradiol administration had no significant effect on the number of immunonegative axosomatic synapses. These data clearly show that physiological levels of estradiol induce a remodeling of the GABAergic axosomatic inhibitory input to arcuate neurons. More recently, we have shown that estradiol treatment does not elicit changes in the number of axodendritic arcuate synapses, although there is a significant increase in the volume density of excitatory spine synapses.

Although it has been generally accepted and evidenced that estrogen exerts a profound influence on synaptic plasticity in the central nervous system, several questions concerning the specificity of action, the role of the estrogen receptors in this process and the intracellular signaling mechanisms have remained elusive. In the present work we have addressed these questions and by using immunohistochemistry and the combination of pre- and postembedding immunostaining we obtained new data on the hormonally induced neuronal plasticity.

Our results clearly demonstrates that 17β -estradiol induces remodeling of axo-somatic synapses in the AvPv in a specific way, because the effect of the hormone differs in different subpopulations of neurons within the nucleus. By using double immunolabeling we evidence that the presence of estrogen receptor beta is decisive in this process. We found a significant increase in the number of GABAergic axo-somatic synapses in ovariectomized female rats treated with 17β -estradiol; this change in synapse number was observed only in neurons which express estrogen receptor beta.

These data confirm earlier observations by Langub et al. (1994) who reported similar increase in axo-somatic synapses of estrogen receptor immunoreactive neurons. With the combination of preembedding estrogen receptor ($ER\alpha$ and $ER\beta$) and postembedding GABA staining we made this observation more specific, because we could demonstrate a well-defined selectivity of estrogen effect at both pre- and postsynaptic levels. Our data show that the hormonal treatment affects only GABAergic synapses which clearly indicate some sort of specificity, but at the same time we have found differences at the level of postsynaptic cells, as well. On the basis of the expression of alfa and beta estrogen receptors we could identify three subpopulations of neurons within the nucleus that respond to endocrine changes differently. The synaptic connectivity of neurons expressing no estrogen receptors or only the $ER\alpha$ type does not change after 17β -estradiol treatment, while there is a hormone-induced increase in the number of synapses in the subpopulation having both $ER\alpha$ and $ER\beta$ receptors.

It was shown earlier, that the distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the AvPv of female rats overlaps that of $ER\beta$ -positive neurons, i.e. dopaminergic neurons are involved in the hormonally induced synaptic remodeling. In experiments studying the dopaminergic (TIDA system) of the arcuate nucleus we have found that the synaptic connectivity of TH-positive neurons are also

specifically affected by the hormone. In this study, we used double immunolabeling to localize and separately analyze the synapses on neurons of the TIDA system and demonstrate that the response to the hormonal treatment is different in the dopaminergic vs. non-dopaminergic neurons.

According to our data, 17 β -estradiol induces synaptic remodeling not only in females, but also in males, and in both sexes the GABAergic synapses are involved in the plastic changes. The hormonally-triggered synaptic plasticity, however, is sexually dimorphic in the sense that in females, inhibitory synapses onto the TH immunoreactive neurons, whereas in males, inhibitory synapses onto non-dopaminergic neurons are affected by the hormone. In ovariectomized females 17 β -estradiol induced synaptic remodeling in the TIDA neurons: the number of GABAergic axo-somatic synapses was significantly lower 24 h after the hormone treatment. The non-labeled arcuate neurons were not affected by 17 β -estradiol, since the synaptic connectivity of those neurons remained unchanged. This observation is in agreement with our earlier results obtained by using systemic application of the tracer Fluorogold to label the subpopulation of arcuate neurons that project to the median eminence. We found that the synaptic connectivity of these “hypophysiotropic neurons” was different from the other neurons that did not take up the tracer, and that the neurons projecting to the median eminence underwent synaptic remodeling in response to 17 β estradiol. The present data confirm, by inference, that the retrograde labeling by Fluorogold identifies TIDA neurons.

A possible approach to study the effect of estrogen on the intracellular signaling mechanisms is to follow the expression pattern of c-Fos. This proto-oncogene is a member of the immediate early gene family and is considered a transcription activator through various signal transduction pathways. The expression of c-Fos, commonly used as a marker of neuronal activation has been implicated in a number of physiological functions such as intracellular signaling, cell differentiation, apoptosis, neural plasticity, learning and memory processes.

The results of our study indicate for the first time that basal c-Fos expression in the accessory olfactory bulb is sexually dimorphic and decreases with age. Estrogen treatment increases the number of cells expressing c-Fos in the AOB.

Because c-Fos is known to be involved in central gene co-ordination, the large number of immunoreactive cells observed in juvenile rats may reflect a higher growth rate and differentiation. We found that the number of c-Fos labeled cells in adult

males is lower compared to adult females. Importantly, this is in contrast to the juveniles where we observed no sex-related differences in the number of labeled cells. This observation may be explained by considering the changing hormonal milieu of animals during various stages of life. As the cyclic influence of estrogen and progesterone on the cascade of cellular signaling has been documented, we have concluded that increased c-Fos expression in the adult females observed in our study could be due to higher levels of circulating estrogen.

The AOB is a sexually dimorphic region perceptive to a variety of sex related queues and plays an important role in sexual behaviour. Altogether, our results suggest that in the AOB there is a population of estrogen-receptive neurons in which c-Fos is involved in the cascade of cellular events. Furthermore, it is probable that this regulation of neuronal activation in the AOB occurs through ER- β and not the alpha subtype, since only the ER- β is present in this region.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Értekezésem az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában készült. Munkám során sok ember támogató segítségét élvezhettem, melyet ezúton köszönök.

Elsősorban témavezetőmnek, dr. Párducz Árpádnak tartozom köszönettel. Végtelen türelme nagyban hozzájárult a dolgozat elkészültéhez. Diák és doktorandusz éveim során nagy hatással voltak rám a munkával és tudománnyal kapcsolatos gondolatai. Gondos vezetése mellett tanultam meg a felhasznált kísérleti módszereket. A kutatási tervek és eredmények megvitatása bővítette ismereteimet és könnyebbé tette munkámat.

Köszönetemet fejezem ki dr. Siklós Lászlónak, aki a csoport jelenlegi vezetőjeként lehetővé tette dolgozatom elkészítését, továbbá köszönöm munkámat segítő hasznos tanácsait és azt, hogy az ajtaja mindig nyitva állt előttem.

Köszönet a csoport minden tagjának segítségükért, barátságukért és végtelen türelmükért, valamint a vidám légkörért, amiben dolgozhattam. Különösen hálás vagyok dr. Hoyk Zsófiának és dr. Csákvári Eszternek, akik tanácsaikkal segítették értekezésem összeállítását.

Hálával tartozom jelenlegi témavezetőmnek, dr. Nagy Tündének támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom családomnak, barátaimnak szeretetükért és biztatásukért, azért, hogy mindig hittek bennem.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abraham IM, Kovacs KJ (2000) Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. *Eur J Neurosci* 12:3003-3014.
- Arai Y, Matsumoto A (1978) Synapse formation of the hypothalamic arcuate nucleus during post-natal development in the female rat and its modification by neonatal estrogen treatment. *Psychoneuroendocrinology* 3:31-45.
- Arnold AP, Breedlove SM (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* 19:469-498.
- Bakker J, Baum MJ, Slob AK (1996) Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience* 74:251-260.
- Breedlove SM, Arnold AP (1983) Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurosci* 3:424-432.
- Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S (1974) Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 60:205-215.
- Calizo LH, Flanagan-Cato LM (2000) Estrogen selectively regulates spine density within the dendritic arbor of rat ventromedial hypothalamic neurons. *J Neurosci* 20:1589-1596.
- Cardinali DP, Vacas MI (1978) Mechanisms underlying hormone effects on pineal function: a model for the study of integrative neuroendocrine processes. *J Endocrinol Invest* 1:89-96.
- Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1993) A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci* 13:5126-5138.
- Chen CL, Meites J (1970) Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86:503-505.
- Cheung S, Will YM, Hentschel K, Moore KE, Lookingland KJ (1997) Role of gonadal steroids in determining sexual differences in expression of Fos-related antigens in tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in subdivisions of the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology* 138:3804-3810.
- Crews D, Wade J, Wilczynski W (1990) Sexually dimorphic areas in the brain of whiptail lizards. *Brain Behav Evol* 36:262-270.
- Csakvari E, Hoyk Z, Gyenes A, Garcia-Ovejero D, Garcia-Segura LM, Parducz A (2007) Fluctuation of synapse density in the arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 144:1288-1292.

- Curran T, Morgan JJ (1995) Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26:403-412.
- Decavel C, van den Pol AN (1992) Converging GABA- and glutamate-immunoreactive axons make synaptic contact with identified hypothalamic neurosecretory neurons. *J Comp Neurol* 316:104-116.
- DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME (1998) Characterization of the dopaminergic input to the pituitary gland throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 67:377-383.
- DeMaria JE, Livingstone JD, Freeman ME (2000) Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 879:139-147.
- DeVoogd TJ, Nottebohm F (1981) Sex differences in dendritic morphology of a song control nucleus in the canary: a quantitative Golgi study. *J Comp Neurol* 196:309-316.
- Dragunow M, Preston K (1995) The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res Brain Res Rev* 21:1-28.
- Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM (2001) Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1952-1957.
- Duncan GE, Johnson KB, Breese GR (1993) Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci* 13:3932-3943.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523-1631.
- Garcia-Segura LM, Baetens D, Naftolin F (1986) Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats. *Brain Res* 366:131-136.
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F (1994) Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 44:279-307.
- Gies U, Theodosius DT (1994) Synaptic plasticity in the rat supraoptic nucleus during lactation involves GABA innervation and oxytocin neurons: a quantitative immunocytochemical analysis. *J Neurosci* 14:2861-2869.
- Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res* 148:333-346.
- Greenberg ME, Ziff EB (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311:433-438.

- Gu GB, Simerly RB (1997) Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol* 384:142-164.
- Halem HA, Cherry JA, Baum MJ (1999) Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 39:249-263.
- Hall JM, McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566-5578.
- Hebb DO. 1949. *The Organization of Behavior*. Wiley. New York.
- Horvath TL, Naftolin F, Leranth C (1993) Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *J Neuroendocrinol* 5:71-79.
- Hughes P, Lawlor P, Dragunow M (1992) Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13:355-357.
- Hutton LA, Gu G, Simerly RB (1998) Development of a sexually dimorphic projection from the bed nuclei of the stria terminalis to the anteroventral periventricular nucleus in the rat. *J Neurosci* 18:3003-3013.
- Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR (1998) Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 780:218-229.
- Kim JM, Lee KW, Chung YH, Shin CM, Baik SH, Cha CI (1999) c-Fos basal immunoreactivity decreases in rat spinal cord during normal ageing. *Neuroreport* 10:585-588.
- Kis Z, Horvath S, Hoyk Z, Toldi J, Parducz A (1999) Estrogen effects on arcuate neurons in rat. An in situ electrophysiological study. *Neuroreport* 10:3649-3652.
- Kitraki E, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulou F (1993) Aging-related changes in IGF-II and c-fos gene expression in the rat brain. *Int J Dev Neurosci* 11:1-9.
- Klintsova AY, Philpot BD, Brunjes PC (1995) Fos protein immunoreactivity in the developing olfactory bulbs of normal and naris-occluded rats. *Brain Res Dev Brain Res* 86:114-122.
- Kovacs KJ (1998a) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33:287-297.
- Kovacs KJ (1998b) Functional neuroanatomy of the parvocellular vasopressinergic system: transcriptional responses to stress and glucocorticoid feedback. *Prog Brain Res* 119:31-43.

- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15677-15682.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930.
- Kurz EM, Sengelaub DR, Arnold AP (1986) Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood. *Science* 232:395-398.
- Langub MC, Jr., Maley BE, Watson RE, Jr. (1991) Ultrastructural evidence for luteinizing hormone-releasing hormone neuronal control of estrogen responsive neurons in the preoptic area. *Endocrinology* 128:27-36.
- Langub MC, Jr., Maley BE, Watson RE, Jr. (1994) Estrous cycle-associated axosomatic synaptic plasticity upon estrogen receptive neurons in the rat preoptic area. *Brain Res* 641:303-310.
- Langub MC, Jr., Watson RE, Jr. (1992) Estrogen receptive neurons in the preoptic area of the rat are postsynaptic targets of a sexually dimorphic enkephalinergic fiber plexus. *Brain Res* 573:61-69.
- Leranth C, Sakamoto H, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1985) Estrogen responsive cells in the arcuate nucleus of the rat contain glutamic acid decarboxylase (GAD): an electron microscopic immunocytochemical study. *Brain Res* 331:376-381.
- Lima D, Avelino A, Coimbra A (1993) Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 4:747-750.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11162-11166.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Matsumoto A, Arai Y (1979) Synaptogenic effect of estrogen on the hypothalamic arcuate nucleus of the adult female rat. *Cell Tissue Res* 198:427-433.
- Matsumoto A, Arai Y (1981) Neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus of adult female rats and its enhancement by treatment with estrogen. *J Comp Neurol* 197:197-205.
- Mitsushima D, Tin-Tin WS, Kimura F (2003) Sexual dimorphism in the GABAergic control of gonadotropin release in intact rats. *Neurosci Res* 46:399-405.
- Naftolin F (1994) Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med* 39:257-261.

- Norgren RB, Jr., Lehman MN (1989) A double-label pre-embedding immunoperoxidase technique for electron microscopy using diaminobenzidine and tetramethylbenzidine as markers. *J Histochem Cytochem* 37:1283-1289.
- Nottebohm F, Arnold AP (1976) Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194:211-213.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26:3505-3512.
- Olmos G, Naftolin F, Perez J, Tranque PA, Garcia-Segura LM (1989) Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 32:663-667.
- Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y (2002) Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3306-3311.
- Orikasa C, Sakuma Y (2003) Possible involvement of preoptic estrogen receptor beta positive cells in luteinizing hormone surge in the rat. *Domest Anim Endocrinol* 25:83-92.
- Panzica G, Viglietti-Panzica C, Balthazart J (2001) Sexual dimorphism in the neuronal circuits of the quail preoptic and limbic regions. *Microsc Res Tech* 54:364-374.
- Parducz A, Hoyk Z, Kis Z, Garcia-Segura LM (2002) Hormonal enhancement of neuronal firing is linked to structural remodelling of excitatory and inhibitory synapses. *Eur J Neurosci* 16:665-670.
- Parducz A, Perez J, Garcia-Segura LM (1993) Estradiol induces plasticity of gabaergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience* 53:395-401.
- Parducz A, Zsarnovszky A, Naftolin F, Horvath TL (2003) Estradiol affects axosomatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. *Neuroscience* 117:791-794.
- Paredes RG, Lopez ME, Baum MJ (1998) Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. *Horm Behav* 33:48-57.
- Peretto P, Giachino C, Panzica GC, Fasolo A (2001) Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res* 306:385-389.
- Peterfi Z, Churchill L, Hajdu I, Obal JF, Krueger JM, Parducz A (2004) Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen. *Neuroscience* 124:695-707.

- Polston EK, Gu G, Simerly RB (2004) Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 123:793-803.
- Polston EK, Simerly RB (2006) Ontogeny of the projections from the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus in the female rat. *J Comp Neurol* 495:122-132.
- Pozzo Miller LD, Aoki A (1991) Stereological analysis of the hypothalamic ventromedial nucleus. II. Hormone-induced changes in the synaptogenic pattern. *Brain Res Dev Brain Res* 61:189-196.
- Priest CA, Roberts JL (2000) Estrogen and tamoxifen differentially regulate beta-endorphin and cFos expression and neuronal colocalization in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 72:293-305.
- Ramon y Cajal S. 1911. *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine. Paris.
- Romano GJ, Krust A, Pfaff DW (1989) Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 3:1295-1300.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-1331.
- Sanchez R, Nguyen D, Rocha W, White JH, Mader S (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 24:244-254.
- Segovia S, Orensanz LM, Valencia A, Guillamon A (1984) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. *Brain Res* 318:312-314.
- Segovia S, Valencia A, Cales JM, Guillamon A (1986) Effects of sex steroids on the development of two granule cell subpopulations in the rat accessory olfactory bulb. *Brain Res* 395:283-286.
- Seternes OM, Sorensen R, Johansen B, Loennechen T, Aarbakke J, Moens U (1998) Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/map kinase- and protein kinase A signaling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites. *Biochim Biophys Acta* 1395:345-360.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Shieh KR, Pan JT (1996) Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. *Biol Reprod* 54:987-992.

- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.
- Sim JA, Skynner MJ, Pape JR, Herbison AE (2000) Late postnatal reorganization of GABA(A) receptor signalling in native GnRH neurons. *Eur J Neurosci* 12:3497-3504.
- Simerly RB (1993) Distribution and regulation of steroid hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Adv Neurol* 59:207-226.
- Simerly RB (1998) Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res* 92:195-203.
- Somogyi P, Hodgson AJ (1985) Antisera to gamma-aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J Histochem Cytochem* 33:249-257.
- Sonnenberg JL, Mitchelmore C, Macgregor-Leon PF, Hempstead J, Morgan JJ, Curran T (1989) Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J Neurosci Res* 24:72-80.
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134 (Pt 2):127-136.
- Temple JL, Scordalakes EM, Bodo C, Gustafsson JA, Rissman EF (2003) Lack of functional estrogen receptor beta gene disrupts pubertal male sexual behavior. *Horm Behav* 44:427-434.
- Theodosis DT, Poulain DA (1984) Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. *Neuroscience* 11:183-193.
- Theodosis DT, Poulain DA, Vincent JD (1981) Possible morphological bases for synchronisation of neuronal firing in the rat supraoptic nucleus during lactation. *Neuroscience* 6:919-929.
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486.
- Valencia A, Segovia S, Guillamon A (1986) Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb mitral cells in the rat. *Brain Res* 389:287-290.
- van den Pol AN (1986) Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons throughout the hypothalamus receive glutamate decarboxylase immunoreactive synapses: a double pre-embedding immunocytochemical study with particulate silver and HRP. *J Neurosci* 6:877-891.

- Wang J, Cheng CM, Zhou J, Smith A, Weickert CS, Perlman WR, Becker KG, Powell D, Bondy CA (2004) Estradiol alters transcription factor gene expression in primate prefrontal cortex. *J Neurosci Res* 76:306-314.
- Watson RE, Jr., Hutchinson RK, Langub MC, Jr., Landis JW, Seksaria S, Rainey DM, Keil LC (1994) Colocalization of natriuretic peptide and estrogen receptor immunoreactivities in preoptic nuclei in the female rat. *J Neuroendocrinol* 6:79-87.
- Wilson DA, Best AR, Sullivan RM (2004) Plasticity in the olfactory system: lessons for the neurobiology of memory. *Neuroscientist* 10:513-524.
- Witkin JW, Ferin M, Popilskis SJ, Silverman AJ (1991) Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129:1083-1092.
- Zhang YQ, Ji YP, Mei J (2000) Behavioral training-induced c-Fos expression in the rat nucleus basalis of Meynert during aging. *Brain Res* 879:156-162.
- Zhao X, Yu B, Wang L, Liu J, Xie W, Xu J (2005) Ovariectomy and persistent pain affect long-term Fos expression in spinal cord. *Neurosci Lett* 375:165-169.